

TESIS DOCTORAL

**"EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE
LA EXCITABILIDAD DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES
DE LA CORTEZA MOTORA"**

Ricardo Pardillo Díaz

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología
Sevilla, 2017



TESIS DOCTORAL

**"EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE
LA EXCITABILIDAD DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES
DE LA CORTEZA MOTORA"**

Ricardo Pardillo Díaz

DIRECTORES

Dr. Pedro Núñez Abades

Dra. Livia Carrascal Moreno

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología
Sevilla, 2017

AGRADECIMIENTOS

Dicen por ahí que es de bien nacido ser agradecido.

Creo que es imposible presentar un proyecto como este sin dar las gracias a todas las personas que han contribuido de una manera u otra a conseguir este objetivo y que haya sobrevivido para contarlo.

A mis directores de la tesis el Dr. Pedro Núñez Abades y la Dra. Livia Carrascal Moreno. Porque me dieron la oportunidad y me abrieron las puertas de este bonito y duro mundo de la electrofisiología. Porque gracias a ellos he seguido aprendiendo y con su esfuerzo y dedicación han conseguido que este proyecto salga adelante.

A mis padres. Porque me lo han dado todo, las ganas y los medios para conseguir este pequeño sueño. Porque de su boca nunca he escuchado un no puedes y todo lo que han dicho y hecho ha sido necesario para convertirme en lo que soy hoy día.

A mi hermano. Porque es ese pequeño gran espejo en el que me tengo que mirar. Porque es el que me demuestra que todo es posible con constancia y trabajo y que si crees en lo imposible serás capaz de lo increíble.

A mis amigos. A los de aquí, los de allí y los de allá. Porque los he escogido como mi familia y me han dado alguno de los mejores momentos y esos ratitos pues son pa ti.

Y por supuesto a ella. Porque siempre va conmigo. Porque está en los días buenos y en los malos, en las risas y en los enfados. Porque ha sido capaz de aguantarme y porque espero que siga siempre ahí acompañándome en esta aventura.

A todos, gracias.

Índice de contenidos	III
Índice de figuras y tablas	IX
Abreviaturas	XV
Resumen	1
Introducción	7
Planteamientos y Objetivos	49
Materiales y Métodos	53
Resultados	69
Discusión	115
Conclusiones	133
Bibliografía	137
Apéndice: Publicaciones y Patentes	159

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	XV
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. Corteza cerebral	9
2.1.1. Neocorteza: citoarquitectura y áreas funcionales	11
2.1.2. Corteza motora primaria	12
2.1.3. Neuronas piramidales	14
2.2. La técnica de <i>patch-clamp</i>	17
2.3. Estrés oxidativo	23
2.3.1. La peroxidación lipídica y el hidróperóxido de cumeno	26
2.3.2. Estudios electrofisiológicos previos sobre el estrés oxidativo	28
2.4. Antioxidantes	29
2.5. Neurodegeneración: implicación del estrés oxidativo y estrategias de neuroprotección	32
2.5.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica e implicación del estrés oxidativo	35
2.5.2. Estrategias de neuroprotección en la Esclerosis Lateral Amiotrófica	43
3. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	49
3.1. Planteamientos e hipótesis	51
3.2. Objetivos	51
4. MATERIALES Y MÉTODOS	53
4.1. Sujetos experimentales	55
4.2. Preparaciones de rodajas cerebrales	55
4.3. Preparación de micropipetas/microelectrodos de <i>patch-clamp</i>	57
4.4. Registros electrofisiológicos de <i>patch-clamp</i> en la configuración de célula entera	57
4.4.1. Registros en fijación de corriente y análisis	58
4.4.2. Registros en fijación de voltaje y análisis	63

4.5. Soluciones farmacológicas	65
4.6. Métodos bioquímicos para la determinación de la peroxidación lipídica	65
4.7. Análisis estadístico	66
5. RESULTADOS	69
5.1. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre el potencial de membrana de reposo en neuronas piramidales de la corteza motora	71
5.2. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la resistencia de membrana en neuronas piramidales de la corteza motora	71
5.3. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la reobase y el voltaje de despolarización en neuronas piramidales de la corteza motora	74
5.4. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la amplitud y la duración del potencial de acción en neuronas piramidales de la corteza motora	76
5.5. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre las propiedades repetitivas de disparo en neuronas piramidales de la corteza motora	78
5.6. Efectos del lavado de hidroperóxido de cumeno sobre la resistencia de membrana y el potencial de membrana en reposo de las neuronas piramidales de la corteza motora	84
5.7. Efectos dosis dependiente del hidroperóxido de cumeno sobre las propiedades de membrana de las células piramidales de la corteza motora	88
5.8. Efectos dosis dependiente del hidroperóxido de cumeno sobre la reobase y el voltaje umbral de las neuronas piramidales de la corteza motora	91
5.9. Efectos dependientes de la concentración de hidroperóxido de cumeno sobre las características del potencial de acción de las neuronas piramidales de la corteza motora	92
5.10. Efectos dosis-dependientes del hidroperóxido de cumeno sobre las propiedades de disparo de las neuronas piramidales de la corteza motora	94
5.11. Naturaleza glutamatérgica y GABAérgica de las entradas sinápticas de las neuronas piramidales de la corteza motora	97
5.12. Efecto de la aplicación de HC sobre las entradas sinápticas excitadoras de las neuronas piramidales de la corteza motora	98

5.13.	Efecto de la aplicación de HC sobre las entradas sinápticas inhibitoras en las neuronas piramidales de la corteza motora	102
5.14.	Contribución del bloqueo de entradas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas en el efecto del HC sobre la excitabilidad neuronal	105
5.15.	Prevención de la peroxidación lipídica causado por el hidroperóxido de cumeno mediante preincubación con melatonina	112
6.	DISCUSIÓN	115
6.1.	Consideraciones generales	117
6.2.	Consideraciones metodológicas	117
6.3.	Alteraciones en las propiedades pasivas de membrana por estrés oxidativo	119
6.4.	Alteraciones en las propiedades activas de membrana por estrés oxidativo	121
6.5.	Depresión del flujo de entradas sinápticas desde las interneuronas premotoras ..	123
6.6.	Origen de la despolarización del potencial de membrana por estrés oxidativo	125
6.7.	La depresión de una corriente tónica dependiente de receptores GABA _A subyace a la hiperexcitabilidad neuronal producida por estrés oxidativo	126
6.8.	Consideraciones funcionales	127
7.	CONCLUSIONES	133
8.	BIBLIOGRAFÍA	137
9.	APÉNDICE: Publicaciones y Patentes	161

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 2.1. La corteza cerebral	10
Figura 2.2. Neuronas piramidales	16
Figura 2.3. Principios básicos de la técnica de <i>patch-clamp</i>	19
Figura 2.4. Configuraciones de la técnica de <i>patch-clamp</i>	20
Figura 2.5. Generación de especies reactivas de oxígeno	24
Figura 2.6. Hidroperóxido de cumeno	28
Figura 2.7. Afectación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del hipogloso por el estrés oxidativo	30
Figura 2.8. Posibles mecanismos implicados en la neurodegeneración de la ELA	38
Figura 2.9. Melatonina	45

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4.1. Obtención, preparación y mantenimiento de rodajas cerebrales, localización de la estructura y elaboración de microelectrodos	56
Figura 4.2. Sistemas de visualización, registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica	59
Figura 4.3. Análisis de los parámetros electrofisiológicos de una neurona piramidal de la corteza motora usando el software Clampit 10.4.	61
Figura 4.4. Análisis de los eventos sinápticos utilizando el Software Stimfit 0.14.	64

RESULTADOS

Figura 5.1. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre el potencial de membrana en neuronas piramidales de la corteza motora	72
Figura 5.2. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la resistencia de membrana en neuronas piramidales de la corteza motora	73
Figura 5.3. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la reobase y el voltaje de despolarización en neuronas piramidales de la corteza motora	75
Figura 5.4. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la amplitud y la duración del potencial de acción en neuronas piramidales de la corteza motora	77
Figura 5.5. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la capacidad de mantener las propiedades repetitivas de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora	79

Figura 5.6. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre la ganancia de las propiedades repetitivas de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora	81
Figura 5.7. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre la corriente de cancelación y la frecuencia máxima de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora	82
Figura 5.8. Efectos del lavado del hidropéroxido de cumeno sobre el potencial de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora.....	85
Figura 5.9. Efectos dosis, tiempo y tamaño dependientes del hidropéroxido de cumeno sobre las neuronas piramidales de la corteza motora	87
Figura 5.10. Efectos de la aplicación secuencial de dosis crecientes de hidropéroxido de cumeno sobre la resistencia de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora	89
Figura 5.11. Efectos dosis y tiempo dependientes del hidropéroxido de cumeno sobre la amplitud del potencial de acción, la duración del potencial de acción, las propiedades repetitivas de disparo, ganancia, frecuencia máxima y corriente de cancelación de las neuronas piramidales de la corteza motora	93
Figura 5.12. Efectos de la aplicación secuencial de dosis cada vez mayores de hidropéroxido de cumeno sobre las propiedades repetitivas de disparo de las neuronas piramidales de la corteza motora	96
Figura 5.13. Efectos de CNQX, APV y gabazina sobre las corrientes postsinápticas espontáneas de las neuronas piramidales de la corteza motora	97
Figura 5.14. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre las corrientes postsinápticas espontáneas excitadoras de las neuronas piramidales de la corteza motora	100
Figura 5.15. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura de las neuronas piramidales de la corteza motora	101
Figura 5.16. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre las corrientes postsinápticas espontáneas inhibitoras de las neuronas piramidales de la corteza motora	103
Figura 5.17. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre las corrientes postsinápticas inhibitoras en miniatura de las neuronas piramidales de la corteza motora	104
Figura 5.18. Efectos de la tetrodotoxina y el hidropéroxido de cumeno sobre la resistencia, el potencial de membrana y la corriente de fijación de las neuronas piramidales de la corteza motora	107
Figura 5.19. Efectos de la gabazina y el hidropéroxido de cumeno sobre la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de la corteza motora	109
Figura 5.20. Caracterización de la corriente tónica GABAérgica y su papel en la despolarización del potencial de membrana	111
Figura 5.21. Prevención de la peroxidación lipídica con melatonina	113

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 2.1. Criterios revisados de El Escorial para el diagnóstico de la ELA con el algoritmo electrodiagnóstico de Awaji incluido 37

RESULTADOS

Tabla 5.1. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la corteza motora 83

Tabla 5.2. Efectos del TTX sobre el potencial de membrana, la resistencia y la corriente de entrada 106

Tabla 5.3. Efectos de la adición de CNQX y APV sobre el potencial de membrana y la resistencia de las células piramidales de la corteza motora 108

Tabla 5.4. Efectos de la adición de gabazina sobre el potencial de membrana y la resistencia de las células piramidales de la corteza motora 108

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

APV: d-amino-fosfonovalerato

ATP: Adenosín trifosfato

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EPSC: Corriente postsináptica excitadora

GABA: Ácido γ -aminobutírico

Gabazina: bromuro 2-(3-carboxipropil)-3-amino-6-metoxifenil-piridazinium

GSH: Glutatión reducido

GSSG: Glutatión disulfuro

HC: Hidroperóxido de Cumeno

HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]etanosulfónico

HNE: 4-hidroxinonenal

IPSC: Corrientes postsinápticas inhibitoras

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LPO: Peroxidación lipídica

MDA: Malondialdehído

mEPSC: Corrientes postsinápticas excitadoras miniatura

miARN: Micro ARN

mIPSC: Corrientes postsinápticas inhibitoras miniatura

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

P(x): Edad postnatal (x)

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

sEPSC: Corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas

sIPSC: Corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

TTX: Tetrodotoxina

RESUMEN

1. RESUMEN

El estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel muy importante en el daño neuronal. Numerosas evidencias apuntan a que contribuyen a la degeneración neuronal que subyace a muchas enfermedades neurodegenerativas, como son la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer. No obstante, los mecanismos específicos responsables de la neurodegeneración no se conocen con exactitud. Este proyecto tiene como finalidad conocer, mediante la técnica de *whole-cell patch-clamp*, el impacto del estrés oxidativo sobre la excitabilidad neuronal y las propiedades funcionales de membrana. El estudio se realizó en neuronas piramidales de la corteza motora usando rodajas de cerebro de ratas jóvenes adultas. La formación de radicales libres derivados de oxígeno fue inducida mediante la perfusión de la rodaja durante un intervalo de 5 a 30 minutos con un hidroperóxido orgánico, el hidroperóxido de cumeno (HC), que produce peroxidación lipídica (LPO).

La exposición de las células a HC 10 μ M produjo grandes cambios en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas, la mayoría de los cuales ya fueron significativos a los 5 minutos tras la aplicación del oxidante. El potencial de membrana de reposo de las neuronas se despolarizó progresivamente durante la exposición. La resistencia de la membrana aumentó a los 5 minutos de aplicación del oxidante, para luego disminuir con respecto al control a los 15 y 30 minutos. Como consecuencia de estos cambios en resistencia se encontraron cambios en la reobase que disminuyó a los 5 minutos y, posteriormente, aumentó a los 15 y 30 minutos tras la administración de HC. El voltaje de despolarización disminuyó progresivamente durante la aplicación del HC, sin cambios en el voltaje umbral, y de forma paralela al descenso en el potencial de membrana de reposo. Además, la amplitud del potencial de acción disminuyó, mientras que la duración del potencial aumentó, de forma progresiva a lo largo del tiempo cuando se aplicó el HC. El efecto del HC sobre las propiedades repetitivas de las neuronas fue heterogéneo. Así, algunas de las neuronas estudiadas (13/30) perdieron completamente la capacidad de disparar repetitivamente potenciales de acción tras la aplicación de HC, mientras que otras conservaron el disparo (17/30). Estas últimas neuronas, sin embargo, disminuyeron de forma progresiva tanto la frecuencia máxima de disparo como la ganancia tras la aplicación del oxidante, mostrando un rango de trabajo mucho menor.

El estrés oxidativo, inducido por el HC, produjo importantes cambios en la excitabilidad neuronal de la corteza motora de forma dosis y tiempo dependiente. A concentraciones de 1 μM , concentración que no produce efecto alguno en otras poblaciones neuronales, el HC produjo el bloqueo de corrientes rectificadoras (sag) y disminuyó la amplitud del potencial de acción y la ganancia de la frecuencia de disparo. No obstante, no se observaron cambios significativos en el resto de parámetros fisiológicos. La administración de HC 100 μM produjo el bloqueo completo de la capacidad de disparar potenciales de acción de forma repetitiva en todas las células registradas. El efecto sobre el resto de parámetros no fue significativamente diferente al producido por 10 μM . El efecto del HC, es además dependiente del tamaño neuronal. Así, las células de mayor tamaño (estimado mediante su capacitancia celular) son las más sensibles al estrés oxidativo. El gran tamaño que presentan las neuronas piramidales y la alta sensibilidad demostrada al estrés oxidativo hacen que esta población neuronal sea mucho más susceptible a la muerte neuronal que otras poblaciones.

Con la finalidad de comprobar si todos estos cambios en las propiedades de membrana eran debidos a un efecto directo sobre las neuronas piramidales o eran consecuencia de alteraciones a nivel presináptico, se estudió el efecto del estrés oxidativo sobre las entradas sinápticas. En general, el HC produjo una depresión de las entradas sinápticas, demostrando así que los cambios funcionales producidos por el estrés oxidativo se deben a mecanismos pre y postsinápticos. En particular, el HC disminuyó la amplitud, frecuencia y constante de bajada de las corrientes postsinápticas espontáneas tanto excitadoras (sEPSC) como inhibitoras (sIPSC). Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre las corrientes postsinápticas miniatura ni excitadoras (mEPSC) ni inhibitoras (mIPSC). Estos resultados podrían deberse a la acción presináptica del HC que causaría una disminución de la liberación de neurotransmisores dependientes de potencial de acción. La disminución de las entradas inhibitoras desde las interneuronas premotoras produjo, a su vez, la disminución de una corriente tónica dependiente de receptores GABA_A presente en las neuronas piramidales. Esta disminución sería la responsable de la hiperexcitabilidad transitoria (aumento de la resistencia junto con una disminución en reobase) encontrada en las neuronas piramidales durante los primeros minutos tras la administración del oxidante. Este incremento en la excitabilidad cortical es característica de pacientes con ELA.

En general, los efectos producidos por el HC fueron irreversibles. Tan sólo cuando el lavado se realizó a los 5 minutos de exposición al oxidante se restableció la normalidad en algunos parámetros, como la resistencia. Este dato es relevante, porque significa que la eficacia de los

agentes neuroprotectores dependería de la etapa en la que se produzca su administración. Así, en este estudio se demostró que la preincubación con el antioxidante melatonina previene la LPO y los cambios electrofisiológicos inducidos por el HC. Nuestros hallazgos permiten proponer a la melatonina como un agente neuroprotector que podría utilizarse como estrategia terapéutica en el tratamiento temprano de enfermedades neurodegenerativas.

En conclusión, podemos decir que el estrés oxidativo, en gran parte a través de la LPO, compromete la excitabilidad neuronal a través de mecanismos pre y postsinápticos, produciendo, entre otros, una hiperexcitabilidad transitoria durante los primeros estadios de la oxidación que es característica de la ELA. Por lo tanto y asumiendo que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de esta patología, proponemos que la LPO, por un lado alterando la inhibición cortical (tónica y fásica) y por otro lado afectando directamente la excitabilidad de las neuronas piramidales, conduciría a la muerte neuronal que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas como la ELA.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Corteza cerebral.

La corteza cerebral desde el punto de vista funcional consiste en una fina capa de neuronas que cubre la superficie de todas las circunvoluciones del cerebro de los animales vertebrados. A lo largo de la evolución esta estructura ha aumentado en complejidad y tamaño relativo, llegando a alcanzar en los mamíferos un alto grado de diferenciación estructural y funcional.

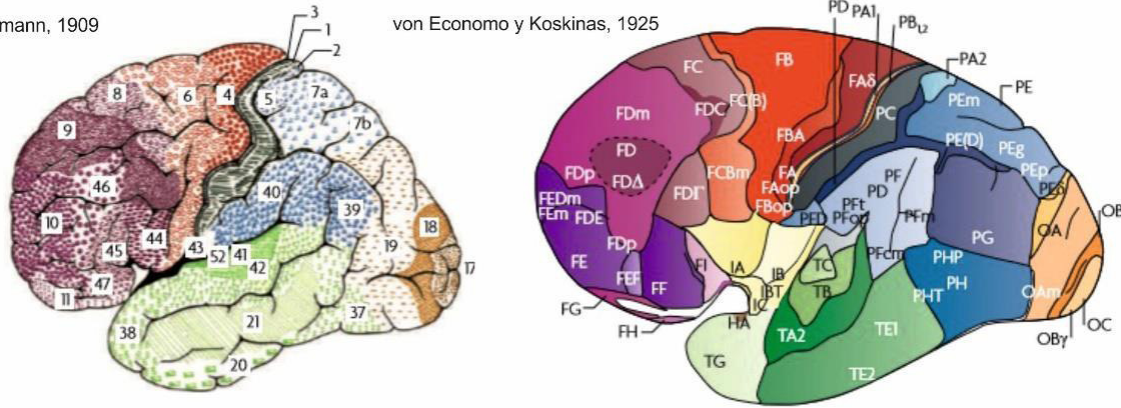
En la corteza cerebral de mamíferos se distinguen dos grandes áreas (Brodmann, 1909; Vogt y Vogt, 1919; Figura 2.1.A): i) Neocorteza, que es el área más evolucionada desde el punto de vista filogenético y en el ser humano constituye el 90% de toda la corteza cerebral. Se divide en 6 capas. Es la responsable de la conciencia y está implicada en todas las funciones mentales superiores y en las funciones ejecutivas (Valverde, 2002); y ii) Allocorteza, que es la menos evolucionada desde el punto de vista filogenético y consta de 3 capas. Se divide a su vez en arquicorteza y paleocorteza. La arquicorteza corresponde con el hipocampo y está implicada en procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria (Thompson y Kim, 1996). La paleocorteza se corresponde con la corteza olfatoria y está implicada en procesos de aprendizaje olfativo (Suzuki y Bekkers, 2007).

La corteza cerebral contiene células gliales, células nerviosas o neuronas y fibras nerviosas organizadas en capas paralelas (Figura 2.1.B). A pesar de presentar una heterogeneidad estructural, neuroquímica y funcional, la corteza cerebral conforma una entidad que presenta múltiples interacciones consigo misma y con el resto del Sistema Nervioso Central (SNC). Con excepción del cerebelo, que recibe influencias corticales de forma indirecta, las demás estructuras del SNC reciben axones originados en la corteza. De esta forma, los axones de la corteza forman parte integral del circuito neuronal de los núcleos de la base, núcleos basales telencefálicos, núcleos del diencefalo, núcleos del tallo cerebral y de la médula espinal. Este sistema de proyecciones participa en los mecanismos de control y ejecución motora, actividades emocionales y cognitivas (Pimienta, 2004). La zona objeto de nuestro estudio es una región perteneciente a la neocorteza y, por ello, a esta estructura le dedicaremos una sección aparte.

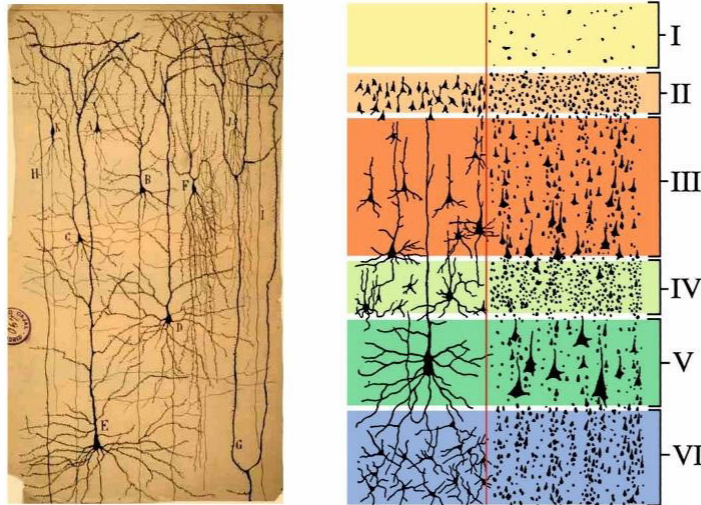
A

Brodman, 1909

von Economo y Koskinas, 1925



B



C

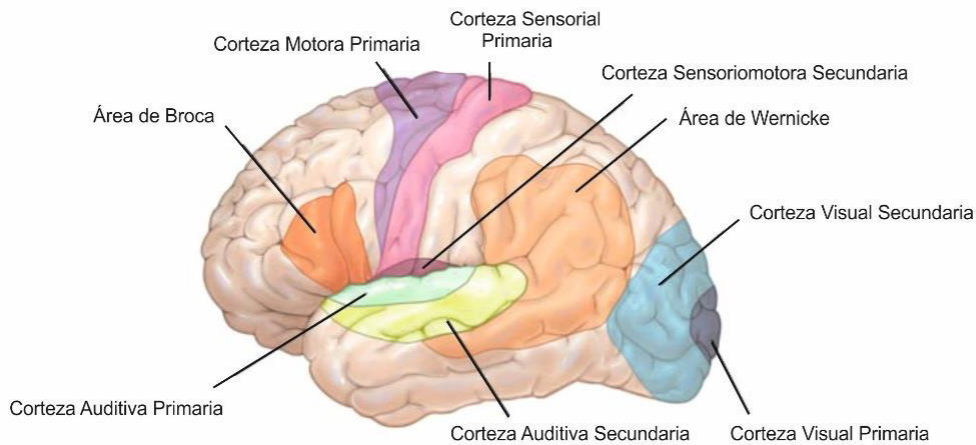


Figura 2.1. La corteza cerebral. A. Ilustraciones que muestran las distintas áreas de la corteza cerebral. A la izquierda se observa la clasificación de las distintas áreas que realizó Brodmann en 1909. A la derecha observamos una revisión realizada por von Economo en 1925. Tomadas de Zilles y Amunts, 2010. B. Imágenes que muestran las distintas capas que podemos observar en la corteza cerebral y los distintos tipos celulares que en ellas se encuentran. A la izquierda se observa una lámina realizada por Ramón y Cajal que nos muestra su visión de las distintas capas de la corteza. A la derecha tenemos un esquema que muestra el número de capas y las células presentes en ellas. Tomado de Ramón y Cajal, 1901; Modificado de Ranson y Clark, 1959. C. Ilustración que muestra las áreas funcionales que podemos encontrar en la corteza cerebral, entre ellas la corteza motora primaria objeto de nuestro estudio.

2.1.1. Neocorteza: citoarquitectura y áreas funcionales.

Numerosos estudios a lo largo del tiempo han centrado su atención en la organización de la corteza cerebral. En este sentido, hay que resaltar la importancia del método de Golgi (Golgi, 1873) que permitió visualizar por primera vez de forma detallada los componentes más relevantes de la corteza y los primeros esquemas de su organización (Figura 2.1.B izquierda). No fue, sin embargo, hasta 1887 que Theodor Meynert describió que la corteza cerebral estaba organizada en una serie de láminas. Desde entonces, esta clasificación se ha ido modificando en diferentes direcciones, siendo en la actualidad la clasificación del neurólogo alemán Korbinian Brodmann la más utilizada. Según Brodmann, desde el punto de vista histológico-anatómico, la neocorteza se divide en 6 capas o láminas que se diferenciaban tanto en el tipo de células que presentaban como en su densidad celular. Estas 6 capas de células fueron numeradas del I al VI, siendo la capa I la más externa y la capa VI la más profunda y la que limita con la sustancia blanca. A continuación, describiremos las principales características de cada capa (Figura 2.1.B derecha):

- Capa I o capa plexiforme externa. También llamada capa molecular o zonal. Se caracteriza por tener una densidad de células muy baja. Presentan numerosas fibras horizontales y numerosas dendritas terminales de las células piramidales de las capas subyacentes.
- Capa II o granular externa. Caracterizada por la presencia de neuronas piramidales de pequeño tamaño y pequeñas células estrelladas.
- Capa III. Caracterizada por presentar neuronas piramidales medianas. En algunos casos se hace distinción entre la capa IIIa (neuronas piramidales más pequeñas) y la capa IIIb (neuronas piramidales más grandes).
- Capa IV o capa granular interna. Se caracteriza como su nombre indica por una gran densidad de células granulares. Esto hace que esta capa se diferencie claramente de sus vecinas colindantes capa III y capa V. Esta capa constituye el estrato de ramificación de las fibras aferentes corticales.
- Capa V o ganglionar. Se caracteriza por presentar grandes células piramidales.
- Capa VI o multiforme. En esta capa existe una gran variabilidad de células según su forma.

Esta organización en capas, que no deja de ser una organización anatómica con cierto fundamento funcional, puede presentar ligeras variaciones a lo largo de la extensión de la neocorteza, perdiéndose en algunos casos algunas de estas láminas. Cada capa tiene su propia individualidad, dada por variedades celulares específicas y por sus conexiones. No obstante, ha de señalarse que estas capas no operan de forma aislada ya que los elementos que las

caracterizan están íntimamente relacionados con los componentes de las otras capas corticales. Una vez conocida su estructura anatómica, se han desarrollado modernos conceptos de operación modular de la corteza en la que ésta se contempla como una organización funcional de grupos celulares verticalmente ensamblados en torno a un eje central representado por fibras aferentes corticales (Eccles, 1981; Lorente de Nó, 1947; Szentágothai, 1978; Valverde, 2002).

Según sus características citoarquitectónicas y funcionales, la neocorteza se suele agrupar en: áreas motoras, áreas sensoriales y áreas de asociación (Figura 2.1.C).

- Áreas sensoriales. Se caracterizan por presentar desde el punto de vista citoarquitectónico una capa IV de gran espesor, en detrimento de la capa V que aparece muy delgada. Son las encargadas del procesamiento de la información sensorial y están organizadas en función del estímulo que procesan (Von Economo, 1929)
- Áreas asociativas. Estas áreas se caracterizan por presentar una menor densidad de células en las capas IV y V. Están implicadas en múltiples funciones de índole muy diversas.
- Áreas motoras. Se localizan en el lóbulo frontal y se caracterizan por presentar una capa IV prácticamente ausente o muy delgada y una capa V muy desarrollada con abundancia de grandes neuronas piramidales. La corteza motora se divide en tres zonas diferenciadas: i) la corteza motora primaria, encargada del control fino de los movimientos voluntarios y en el aprendizaje de nuevas habilidades motoras (Hosp y col., 2011); ii) la corteza premotora encargada de los movimientos voluntarios en relación con las aferencias sensoriales; y iii) el área motora suplementaria relacionada con la planificación e iniciación de los movimientos.

2.1.2. Corteza motora primaria.

La corteza motora está situada en el lóbulo frontal por delante del surco central y se prolonga sobre la superficie medial del hemisferio. Esta corteza se caracteriza por presentar agrupaciones neuronales funcionales muy concretas, donde la estimulación eléctrica con baja intensidad de corriente produce movimientos producidos por un solo músculo (Peters y col., 2017). Estas zonas presentan una estructura columnar que se extienden perpendicularmente desde la superficie hasta la profundidad de la corteza. Estos conjuntos radiales de puntos de estimulación se han denominado con el término columnas motoras corticales. Estas columnas motoras reciben a través de la corteza premotora, aferencias de receptores sensoriales procedentes del músculo diana, la articulación que se inserta el músculo y desde la piel que

recubre el músculo, es decir, de los receptores sensoriales que se estimulan cuando el músculo diana se contrae (Asanuma, 1981).

La corteza motora primaria o área M1, se corresponde con el área 4 de Brodmann y se caracteriza por presentar células piramidales gigantes de Betz (Zilles y Amunts, 2010). Existen diversos estudios de estimulación eléctrica que han demostrado, tanto en humanos (Rasmussen y Penfield, 1947) como en modelos animales de experimentación (Woolsey, 1946), la presencia de un mapa topográfico de la mitad del cuerpo contralateral comparable a la del área sensitiva primaria. Esta corteza motora recibe aferencias tanto de regiones corticales como subcorticales. Las aferencias que vienen de la zona subcortical se originan principalmente del núcleo dentado contralateral, a través de la porción posterior del núcleo ventral lateral del tálamo, y del globo pálido ipsilateral a través de la porción anterior del mismo núcleo talámico. Por otra parte, las aferencias corticales que se dirigen hacia la corteza motora primaria se originan en áreas motoras no primarias (premotora y área suplementaria), en la corteza somatosensitiva primaria y en la corteza de asociación somatosensitiva (Dum y Strick, 2005; Huerta y Pons, 1990; Miyachi y col., 2005; Morecraft y Van Hoensen, 1993). La información que procede del área somatosensitiva primaria viene organizada topográficamente y de ahí que la corteza de asociación proporcione a la corteza primaria la información necesaria sobre la localización de las partes del cuerpo para controlar los movimientos de las extremidades.

Por otro lado, la corteza primaria envía eferencias a partir de las neuronas piramidales hacia la médula espinal y el tálamo a través de la vía corticofugal, y hacia la corteza contralateral y los ganglios basales por la vía comisural (Oswald y col., 2013). De la vía corticofugal surge la vía corticoespinal o piramidal, la principal eferencia que parte desde la corteza motora primaria a través de la cual envían las neuronas piramidales sus axones que proyectan hacia la médula espinal. Estas fibras se dirigen hacia interneuronas premotoras o bien hacia las motoneuronas directamente. Mediante la primera conexión la corteza motora primaria es capaz de controlar el movimiento de grandes grupos musculares. Por otra parte, la conexión directa con las motoneuronas le confiere a la corteza la capacidad para ejecutar movimientos finos muy graduados y precisos, como por ejemplo los movimientos independientes de los dedos (Kuypers, 1987). En un principio se pensó que las neuronas de la corteza motora primaria eran las únicas capaces de iniciar y controlar el movimiento a través de la vía piramidal, y por eso se les llamó a las neuronas de esta corteza “neuronas motoras primarias”. Sin embargo, ciertas formas de movimiento, como el caminar, se conservan aún eliminando toda la corteza motora primaria (Peters y col., 2017). Además, experimentos realizados en primates han demostrado que la lesión

de la corteza motora primaria provoca una parálisis temporal en estos animales tras la cual hay una recuperación sustancial, lo que demuestra que existen otras estructuras que estarían implicadas en la ejecución de los movimientos (Fulton, 1939; Murata y col., 2015). Por el contrario, si la lesión se produce en la vía piramidal, tanto en primates como en roedores, se produce un déficit permanente en la capacidad de realizar movimientos que requieran cierta habilidad (Alaverdashvili y Wishaw, 2008; Peters y col., 2017; Travis y Woolsey, 1956). En la actualidad, tras muchas evidencias, se sabe que la porción motora de la vía piramidal no sólo se origina en la corteza motora primaria, sino que también participan otras estructuras motoras no primarias como la corteza premotora o el área suplementaria. Por esta razón, estas últimas estructuras tienen potencial para poder influir en el control y la ejecución de los movimientos, independientemente de la corteza motora primaria.

Durante mucho tiempo se ha considerado que la función de la corteza motora primaria era únicamente la ejecución de los movimientos. Sin embargo, hoy en día se sabe que la corteza motora primaria también participa en el diseño y planificación de los movimientos. Por tanto, la corteza es parte importante del llamado “aprendizaje motor” o lo que es lo mismo, la capacidad que tienen los animales de adaptar sus movimientos dependiendo de las necesidades y demandas del entorno (Peters y col., 2017).

2.1.3. Neuronas piramidales.

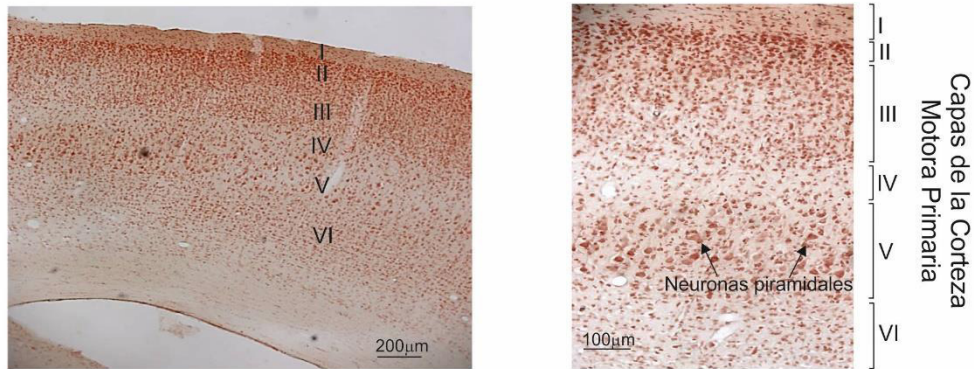
La corteza cerebral, y por ende la corteza motora, presenta una gran diversidad de células. No obstante, pueden englobarse en dos grandes grupos atendiendo básicamente a su tamaño, forma y árbol dendrítico: neuronas piramidales y neuronas no piramidales (Golgi, 1886; Ramón y Cajal, 1899). Las neuronas piramidales, llamadas por Cajal células de axón largo (Ramón y Cajal, 1892), constituyen la esencia de la arquitectura cortical ya que representan aproximadamente un 70-85% del total de la población neuronal. Son células excitadoras cuyos axones, como ya se ha mencionado, proyectan fuera de la corteza cerebral. Las neuronas no piramidales son las interneuronas corticales o células de axón corto. Estas células presentan axones que se restringen a los límites de la corteza cerebral y presentan un carácter inhibitor (Valverde, 2002).

Las neuronas piramidales se encuentran en la mayoría de las estructuras prosencefálicas, incluidas la corteza cerebral, el hipocampo y la amígdala. Sin embargo, no se encuentran en otras estructuras como el bulbo olfatorio, el núcleo estriado, el mesencéfalo, el rombencéfalo, ni en la médula espinal (Ramón y Cajal, 1901). Las estructuras en las que sí se encuentran las neuronas

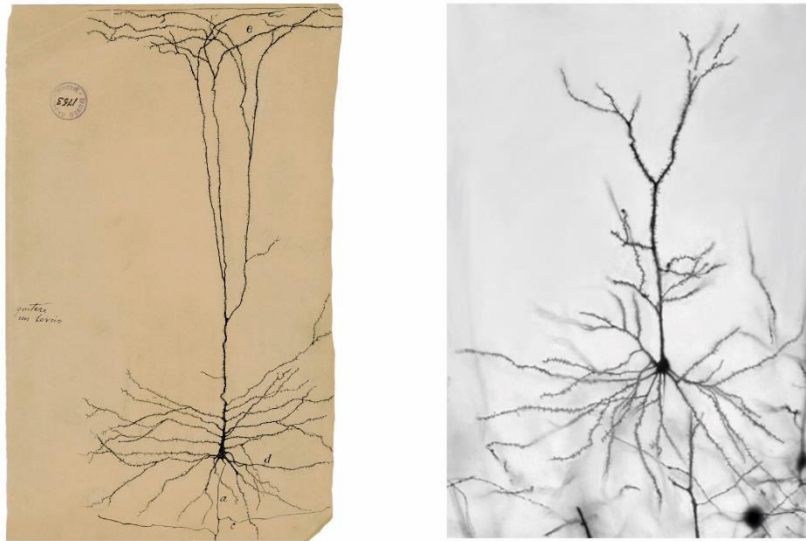
piramidales están implicadas en funciones cognitivas muy avanzadas, por lo que son células que en los últimos años han recibido una gran atención con el objeto de dilucidar las bases neuronales de estas funciones tan sofisticadas (Molnar y Cheung, 2006; Spruston, 2008). Estas neuronas están presentes en todas las capas de la corteza cerebral excepto en la capa I, siendo las células más abundantes a nivel de las capas II, III, V y VI (Figura 2.2.A). Estas células son glutamatérgicas y dan lugar a la mayor parte de las sinapsis excitadoras corticales (DeFelipe y Fariñas, 1992). Desde el punto de vista morfológico se caracterizan por presentar un soma triangular o piramidal del que parte una dendrita apical que asciende hacia la superficie, alcanzando en la mayoría de los casos la capa I. En la superficie, esta dendrita apical se ramifica en numerosas colaterales formando el penacho dendrítico terminal. Por otro lado desde el cuerpo celular parte un abanico de dendritas basales de longitud variable (Ramón y Cajal, 1892; Spruston, 2008; Figura 2.2.B). Tanto las dendritas terminales como las dendritas basales están recubiertas de espinas dendríticas, exceptuando las 10-20 μm que se encuentran más cercanas al soma. Las espinas dendríticas son pequeños procesos colaterales que aumentan considerablemente la superficie dendrítica y, por tanto, constituyen los lugares para el establecimiento de las conexiones sinápticas. De hecho, las espinas dendríticas constituyen el principal elemento postsináptico de las sinapsis excitadoras de la neocorteza, mientras que el tallo dendrítico, el axón y el soma establecen principalmente conexiones con las interneuronas inhibitoras GABAérgicas (Elston y DeFelipe, 2002; Spruston, 2008). Las espinas dendríticas presentan una gran plasticidad sináptica, proceso que se ve alterado en muchas patologías degenerativas del SNC (Fogarty y col., 2016).

Los axones de las células piramidales salen directamente desde el soma o desde una dendrita basal y proyectan hacia la sustancia blanca. Durante su recorrido los axones van emitiendo colaterales hacia distintas zonas de la corteza cerebral (DeFelipe, 1994). Numerosos estudios han puesto de manifiesto que las células piramidales de cada capa cortical participan en distintos circuitos sinápticos y envían sus proyecciones a diferentes regiones del sistema nervioso (Feldman y Kastin, 1984). En general, las capas II-III presentan principalmente conexiones cortico-corticales (ipsi- y contralaterales), mientras que las capas V y VI proyectan principalmente a centros subcorticales (Valverde, 2002).

A



B



C

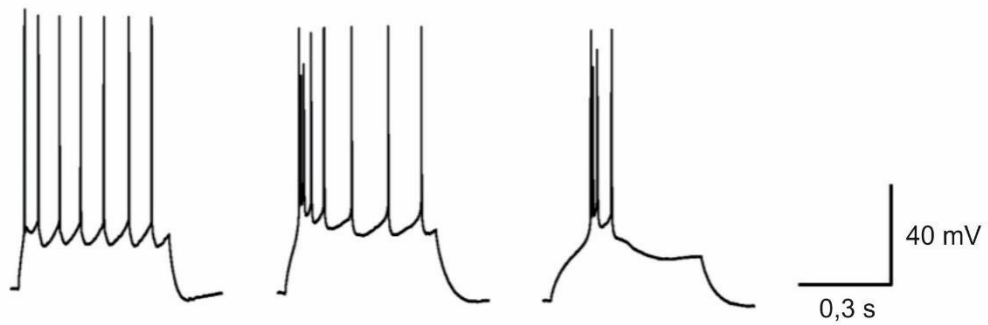


Figura 2.2 Neuronas piramidales. **A.** Fotografías realizadas en nuestro laboratorio mediante una tinción rojo neutro que muestran un corte transversal de la corteza cerebral en las que se aprecian las distintas capas de la corteza motora primaria. **B.** Morfología típica de una neurona piramidal de la corteza. A la izquierda, una lámina de Ramón y Cajal en la cual dibujó la neurona piramidal tal y como él la observó en una tinción de Golgi. Tomado de Ramón y Cajal, 1901. A la derecha se observa una neurona piramidal con las técnicas actuales. Tomado de Kolb y col., 2003. **C.** Distintos patrones de disparo que puede presentar una neurona piramidal. A la izquierda y en el centro se observa un patrón de disparo tónico, mientras que a la derecha se observa un patrón en brote (poco común). Tomado de Zaitsev y col., 2012.

Las neuronas objeto de nuestro estudio son las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral. En estudios realizados en roedores se ha demostrado que todas las células piramidales dentro de esta capa no presentan el mismo tamaño y características. Así, aunque estas células se caracterizan por presentar un soma de gran tamaño, las neuronas piramidales con somas sensiblemente más pequeños se suelen situar en las zonas inferiores de la capa V, cercanos a la VI, mientras que las más grandes se suelen situar más arriba (Figura 2.2.A). Esta separación realmente no es una separación física propiamente dicha ya que en general tanto las células grandes como las pequeñas aparecen entremezcladas en la capa. Sin embargo, las neuronas piramidales no se suelen dividir atendiendo a la morfología celular sino a los sitios donde proyectan. Así, estas neuronas se suelen clasificar dentro de dos grandes grupos: piramidales que proyectan a estructuras subcorticales (médula espinal, colículo superior...) y piramidales que proyectan a la corteza contralateral (Hallman y col., 1988; Kasper y col., 1994). Estas neuronas desde el punto de vista morfológico son exactamente iguales hasta la edad postnatal 5 (P5), alcanzando en ambos casos las dendritas apicales la capa I. Posteriormente entre P5 y P7, la mayoría de las neuronas cortico-corticales retraen sus penachos apicales desde la capa I hasta la capa II/III (IV en los que esté presente), mientras que las neuronas que proyectan a estructuras subcorticales siguen alcanzando la capa I con su dendrita apical (Hallman y col., 1988; Kasper y col., 1994). También se han descrito diferencias electrofisiológicas entre estas dos poblaciones de neuronas piramidales de la capa V. Así, las neuronas que proyectan a estructuras subcorticales presentan menos resistencia y constante de tiempo de membrana que las neuronas que proyectan a estructuras corticales, y además se suelen caracterizar por un disparo en brote a diferencia del disparo regular de las cortico-corticales (Larkman y Mason, 1990; Mason y Larkman 1990; Zaitsev y col., 2012; Figura 2.2.C). Sin embargo, estas últimas diferencias en el disparo repetitivo, se ha demostrado recientemente que podría ser el resultado de los efectos de los anestésicos, puesto que no se han encontrado diferencias en el disparo repetitivo cuando el animal se anestesia por periodos muy cortos previos al registro neuronal (Christophe y col., 2005). En nuestro estudio, no se encontraron grandes diferencias entre las propiedades repetitivas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria y por eso no se realizaron distinciones entre estas dos poblaciones de neuronas.

2.2. La técnica de *patch-clamp*.

Hemos realizado registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp* con el objetivo de poder caracterizar las propiedades electrofisiológicas pasivas y activas de las neuronas piramidales de la corteza motora, y posteriormente examinar los efectos de la

peroxidación lipídica (LPO) sobre las características eléctricas de la membrana y sus propiedades sinápticas.

Hace más de 200 años Luigi Galvani descubrió que la funcionalidad del sistema nervioso está ligada intrínsecamente a la actividad eléctrica. Desde entonces, generaciones de investigadores han invertido un gran esfuerzo para intentar construir instrumentos capaces de medir esta actividad eléctrica (Verkhatsky y col., 2006). En el siglo XIX ya comenzaron a registrarse algunos eventos electrofisiológicos mediante galvanómetros, aunque no fue hasta principios del siglo XX (1920) que se pudieron realizar mediciones algo más precisas de eventos rápidos cuando apareció el osciloscopio de rayos catódicos (del Castillo, 1997). Pero, probablemente, la mejora que dio origen a las nuevas y modernas técnicas de registro fue el electrodo de registro intracelular. Así, entre 1939 y 1942, mediante la utilización de microelectrodos de vidrio, Cole y Curtis, y Hodgking y Huxley, obtuvieron los primeros registros intracelulares en el calamar gigante. En 1952 estos dos últimos autores demostraron el papel fundamental que tienen los canales iónicos en la transmisión del impulso eléctrico, valiéndoles a estos autores el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1963 por estos estudios. El desarrollo tecnológico de amplificadores, estiradores de pipetas y microscopios ha permitido ir mejorando la precisión y especificidad de estos registros intracelulares, que hoy en día alcanzan una sensibilidad y resolución tal, que nos permiten estudiar células mucho más pequeñas e incluso restringir estos registros a axones y/o dendritas.

Aunque los registros intracelulares supusieron un salto de gigante en cuanto al registro de la actividad eléctrica de células excitables, tienen el inconveniente de producir una corriente de fuga o deriva eléctrica como consecuencia de la penetración del electrodo dentro de la célula. Esta fuga impide medir corrientes transmembrana aisladas, así como los valores reales de otros parámetros. A finales de los años 70, los alemanes Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron una técnica innovadora conocida con el nombre de *patch-clamp*, que utilizaba en lugar de los microelectrodos clásicos intracelulares unas micropipetas no penetrantes, quedando solucionado así el problema de la deriva eléctrica. El desarrollo de esta nueva herramienta de estudio revolucionó la electrofisiología hasta tal punto que permitió estudiar incluso la actividad electrofisiológica de un canal único (Hamill y col., 1981; Hille, 1992; Figura 2.3). El desarrollo de esta técnica les supuso a sus autores el Premio Nobel de Medicina en 1991. De una forma más detallada, la técnica de patch clamp se basa en el uso de una micropipeta de vidrio con una abertura de aproximadamente 1-5 μm en su punta. Esta pipeta se rellena con una solución cuya

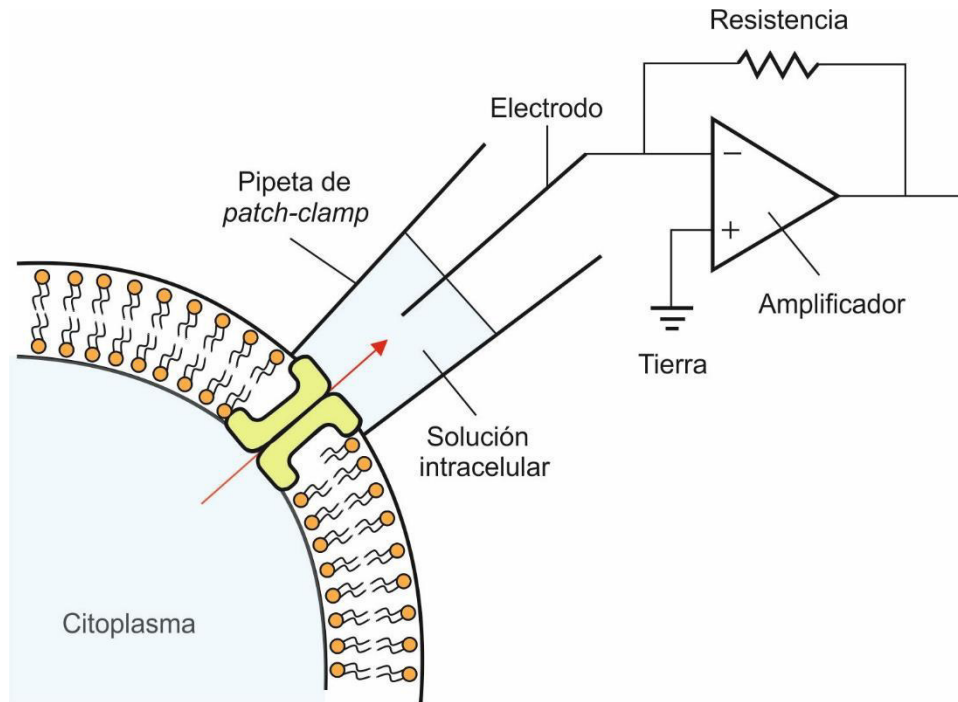


Figura 2.3. Principios básicos de la técnica de *patch-clamp*. Esquema que muestra los elementos básicos necesarios para realizar la técnica de *patch-clamp* y registrar la actividad electrofisiológica de una neurona. Podemos observar la pipeta de patch que contiene la solución intracelular adherida completamente a la neurona. Dentro de la pipeta tenemos el electrodo de registro el cual va a enviar las señales registradas al amplificador para su detección y análisis posterior.

composición depende del estudio específico a realizar o a la configuración de la técnica de *patch-clamp* usada. Dentro del vidrio se sitúa un electrodo de metal, normalmente plata, en contacto con esta solución. Este electrodo es el encargado de conducir los cambios eléctricos a un amplificador de voltaje. La eficiencia de esta técnica requiere que la membrana de la neurona a registrar esté libre, es decir, separada de otras células, libre de tejido conectivo y de restos celulares, para que de esta forma la pipeta se pueda adherir correctamente a la membrana celular (Figura 2.4.A). Para conseguir el registro de las células la micropipeta se coloca presionando a la membrana celular, y a continuación se aplica succión para absorber la membrana dentro de ella, consiguiéndose así formar un sello eléctrico de alta resistencia, el *giga-ohm* o giga-sello (Figura 2.4.B). De esta manera se obtiene un parche (*patch* en inglés) al que se le puede fijar (*clamp* en inglés) ya sea la corriente o el voltaje. Cuando se fijan los niveles de voltaje, se habla de técnica de fijación de voltaje o *voltage clamp* y lo que se registran son los cambios en corriente. Cuando se fijan los niveles de corriente se habla de técnica de fijación de corriente o *current clamp* y lo que se miden son los cambios en voltaje. En el *patch-clamp* se puede mantener el voltaje en un

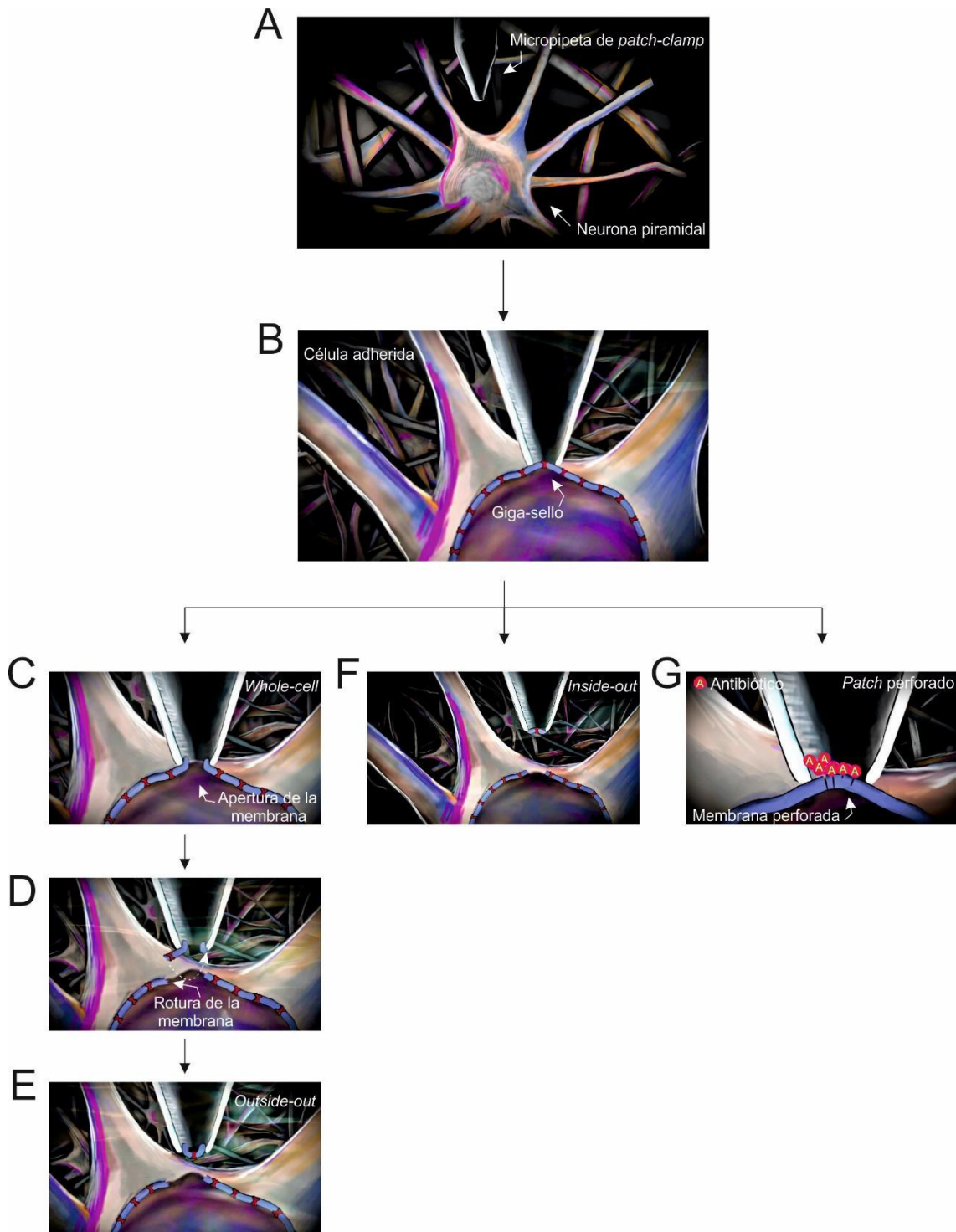


Figura 2.4. Configuraciones de la técnica de patch-clamp. Esta figura muestra las distintas configuraciones que existen hoy en día de la técnica de patch-clamp. **A.** Acercamiento de la pipeta a la superficie de la membrana celular. **B.** Formación del giga-sello y configuración de célula adherida. **C.** Configuración de célula entera o *whole-cell*. **D.** Rotura y separación de la membrana celular para realizar la configuración de fuera hacia dentro *outside-out*. **E.** Configuración de fuera hacia dentro o *outside-out*. **F.** Configuración de dentro hacia fuera o *inside-out*. **G.** Configuración de *patch* perforado en célula entera mediante el uso de antibióticos. Modificado de Torres y Carrascal, 2015.

nivel constante (*voltage clamp* o técnica de fijación de voltaje) mientras se registran los cambios de corriente, o fijar la corriente (*current clamp* o técnica de fijación de corriente) en la célula y registrar los cambios de voltaje. A partir de las primeras aproximaciones a la técnica de *patch-clamp* fueron surgiendo mejoras y modificaciones. Así, existen hoy en día varias configuraciones derivadas de la técnica de *patch-clamp*. Todas ellas parten desde la formación del giga-sello, y el uso de cada una de ellas depende del objetivo del estudio:

Patch célula-adherida (cell-attached; Figura 2.4.B). Esta sería la configuración inicial en todos los casos y por lo tanto a priori la más sencilla. Consiste básicamente en la formación del sello de alta resistencia o giga-sello, manteniéndose durante todo el registro el electrodo sellado a la membrana celular. En esta configuración después de producir el sello en la membrana con la micropipeta no se aplica succión para romper la membrana. Esta técnica presenta la ventaja de poder registrar corrientes en el entorno fisiológico de la célula porque no modifica el medio intracelular, y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores de los canales iónicos. Como desventaja cabe resaltar que en esta configuración no es posible conocer el potencial de membrana real de la célula, ni se puede modificar el medio intracelular.

Patch de célula entera (whole-cell patch; Figura 2.4.C). En esta configuración, después de realizarse el giga-sello en la membrana con la micropipeta, se aplica más succión para romper parte de la membrana produciéndose un acceso al espacio intracelular. Tras la rotura del parche de membrana, la solución interna de la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el volumen celular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo. En estas condiciones, en la configuración de voltaje es posible fijar el potencial de membrana al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica. Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero tiene el inconveniente de que diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con adenosín trifosfato (ATP) y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos.

Patch perforado en célula entera (perforated whole-cell patch; Figura 2.4.G). Esta configuración se ideó para tratar de minimizar la dilución de los mediadores intracelulares en la

configuración anterior. Para obtener esta configuración la pipeta se rellena con una solución que contiene un antibiótico (nistatina, gramicidina, anfotericina B). Una vez que se ha formado el sello de alta resistencia o giga-sello, en lugar de aplicar de nuevo succión y romper la membrana, el antibiótico va generando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. Así, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de ≈ 30 min, momento en el que se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Patch interior-fuera (inside-out patch; Figura 2.4.F). Después de la formación del giga-sello la micropipeta se retira rápidamente de la célula, de esta forma el parche de la membrana queda unida a la micropipeta quedando así el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Se utiliza esta configuración cuando se desea investigar los canales iónicos aislados desde la superficie intracelular.

Patch de fuera hacia adentro (outside-out patch; Figura 2.4.D-E). Esta configuración parte de la configuración de célula entera. Desde esta configuración el electrodo es lentamente retirado de la célula, permitiendo la formación de una ampolla en la membrana de la célula. Cuando el electrodo se separa lo suficiente, esta ampolla se separa de la célula quedando pegada al final del electrodo con la parte exterior de la membrana hacia medio extracelular. Se utiliza como en la configuración anterior para el estudio de las propiedades de un canal iónico aislado de la célula, aunque desde la superficie extracelular.

Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “*patch* escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo, presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

A pesar de no ser la primera técnica en usarse, la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula entera es la que más auge ha tenido. Con esta configuración se puede registrar la actividad eléctrica de la célula, al igual que con la técnica intracelular clásica pero sin fuga de corriente, y se puede manipular tanto el exterior como el interior celular. En nuestro estudio elegimos usar esta configuración ya que permite medir la resistencia de entrada real de

las neuronas y otros parámetros de membrana importantes, como las propiedades repetitivas de las células. Esta configuración también permite el registro de eventos sinápticos muy pequeños, así como el efecto de neurotransmisores y otros fármacos sobre dichas corrientes.

2.3. Estrés oxidativo.

El término estrés oxidativo fue acuñado por primera vez en 1985 por el doctor Helmut Sies en su obra titulada “Estrés oxidativo”. El doctor Sies calificó el estrés oxidativo como una perturbación en el balance prooxidante/antioxidante en favor del primero (Sies y Cadenas, 1985), es decir, cuando la producción de especies reactivas (prooxidantes) supera la capacidad antioxidante de los tejidos. No existe una clasificación del estrés oxidativo como tal pero algunos autores proponen una división en tres categorías: estrés oxidativo basal, estrés oxidativo moderado y estrés oxidativo severo (Navarro-Yepes y col., 2014). El estrés oxidativo puede estar desencadenado por la producción de radicales libres mediante procesos exógenos como la radiación ionizante, ultrasonidos, fotooxidación o infecciones bacterianas y víricas o procesos endógenos (Niedzielska y col., 2016). Por otra parte, en nuestro organismo existen distintos tipos de oxidantes biológicos causantes del daño oxidativo. Entre estos oxidantes encontramos los productos derivados de los procesos en los que participan las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Niedzielska y col., 2016). Aunque no se nombran tan a menudo como las ROS, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) también son una parte importante en la aparición del estrés oxidativo ya que pueden provocar daños graves en las células a través de los peroxinitritos que se descomponen rápidamente en hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), ión nitrito (NO_2^-) o nitrilo (NO_2^+) (Bedard y Krause, 2007; Niedzielska y col., 2016). A parte de las mencionadas ROS y RNS hay más especies reactivas que intervienen en los procesos redox y que por tanto pueden contribuir al estrés oxidativo. Una de ellas son las especies reactivas halogenadas generadas por la acción de la mieloperoxidasa, enzima que produce ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H_2O_2 y Cl^- . Esta enzima se encuentra en los fagocitos y aumenta considerablemente cuando existen procesos inflamatorios (Fernández, 2015). Otras especies reactivas son las provenientes de azufre, de carbonilo o de selenio (Sies y col., 2017).

La gran reactividad de las moléculas de oxígeno se debe a su estructura electrónica ya que tienen dos electrones desapareados. Gracias a esto pueden generar reacciones de un electrón que son básicas en la respiración celular, la cadena de transporte electrónico y la acción oxidativa de los macrófagos (Niedzielska y col., 2016; Paiva y Bozza, 2014). Estas reacciones son la fuente de distintas especies reactivas como ROS y RNS entre las que encontramos radicales de

anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) o los aniones peroxinitritos ($ONOO^-$) (Popa-Wagner y col., 2013).

Las ROS se generan a bajos niveles de concentración en todas las células de nuestro organismo como consecuencia del metabolismo aeróbico producido por la respiración mitocondrial (Figura 2.5) y poseen, a concentraciones fisiológicas, un papel importante en funciones de mediación y regulación (Hool, 2006; Niedzielska y col., 2016). Además, constituyen un mecanismo de defensa usado por las células del sistema inmune para luchar contra los patógenos, un arma bioquímica que bien usada provoca un beneficio para el individuo, pero que fácilmente puede causar daño a otras células del organismo (Sha y col., 2013). La reactividad de las ROS/RNS les permite interactuar con lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos modificando su estructura y su función (Niedzielska y col., 2016). En concreto, las membranas son el objetivo principal de las ROS ya que van a descomponer los ácidos grasos poliinsaturados formando aldehídos reactivos como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (HNE), los cuales a su vez pueden reaccionar con el ADN y las proteínas y modificar su estructura y función (Fritz y Petersen, 2013).

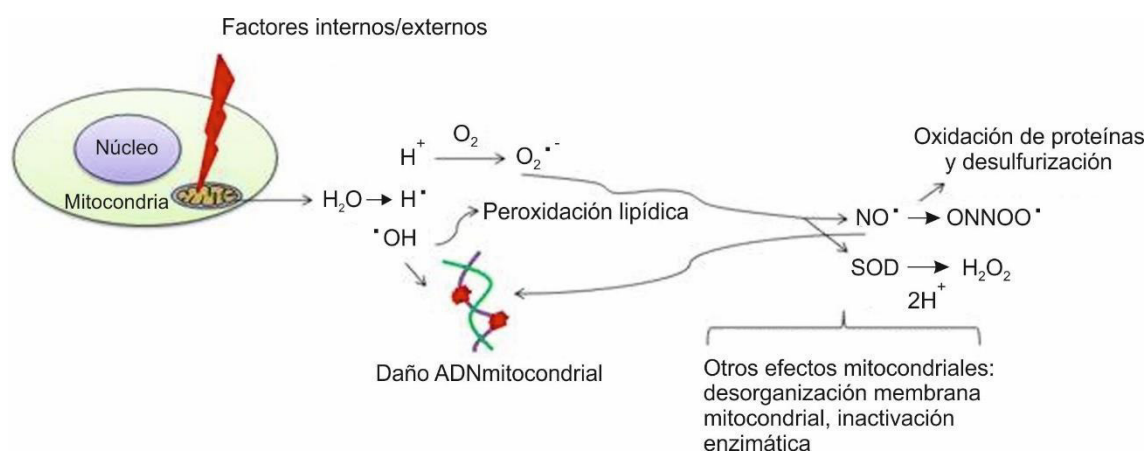


Figura 2.5. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esquema que muestra cómo se generan las ROS en la mitocondria. Los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) y ácido nítrico (NO^{\cdot}) producen la peroxidación lipídica (LPO) y daños en el ADN mitocondrial. Por su parte, el radical peroxinitrito ($ONNOO^{\cdot}$) provoca la oxidación de proteínas y la desulfurización. La superóxido dismutasa (SOD) neutraliza algunos de estos radicales libres generando H_2O_2 y H_2O . Modificado de Islam, 2016.

La aparición de niveles excesivos de ROS puede ocasionar en el organismo la afectación de diversas vías de señalización intracelular que incluyen a numerosos factores de transcripción (NF- κ B, AP-1, HIF-1, etc.), quinasas (MAPK, JNK), fosfatasa, citoquinas, factores de crecimiento

y, por supuesto, a las enzimas antioxidantes. Altos niveles de ROS aparecen en muchas situaciones como en la disfunción mitocondrial, shock excitotóxico o en la inflamación, y pueden provocar daños a las proteínas, ADN y lípidos, lo que conlleva una alteración en las funciones celulares. Además, pueden afectar a diferentes factores de transcripción, factores de crecimiento, kinasas, fosfatasa y citokinas (Arrigo, 1999; Emerit y col., 2004; Tirosh y col., 2000; Valencia y Moran, 2004; Vimard y col., 2011). Así mismo, se ha descrito que las ROS pueden modificar los canales (las corrientes de K^+ ATP-dependientes, las corrientes de Ca^{2+} tipo L y las corrientes rectificadoras de K^+) y los transportadores iónicos, directa o indirectamente, a través de la peroxidación de los lípidos de la membrana o afectando a la configuración proteica y/o moléculas de señalización asociadas (Goldhaber y col., 1989; Goldhaber y Liu, 1994; Hool, 2006; Jovanovic y Jovanovic, 2013; Kourie, 1998; Racay y col., 1997; Zhu y col., 2005).

Existen numerosas causas y mecanismos por los que el cerebro es extremadamente vulnerable a la acción de las ROS. Estas alteraciones pueden ser tanto bioquímicas, como moleculares o fisiológicas. Aunque ya hemos comentado que estas ROS se generan en todas las células del organismo, es el cerebro de los mamíferos, y por ende el nuestro, el tejido más vulnerable a la acción de estos compuestos. Esta vulnerabilidad se debe en parte a la gran necesidad de oxígeno del cerebro, ya que éste consume aproximadamente un 20% del total de oxígeno global disponible, y a su alto contenido en lípidos (Niedzielska y col., 2016). El daño ocasionado en el tejido cerebral va a depender de varios factores, pero también del tipo de ROS, ya que hay algunas especies muy reactivas como HO^\cdot o $ONOO^-$ que van a reaccionar en el mismo lugar en el que se generan. Otras como $O_2^{\cdot-}$ son menos reactivas y pueden viajar más lejos y provocar daños en zonas más específicas (Cordeiro, 2014). Por otro lado, las neuronas son más susceptibles al estrés oxidativo que otros tipos celulares debido a su limitada capacidad antioxidante. La vitamina C, por el contrario, sí se encuentra en altas concentraciones tanto en la sustancia gris como en la blanca (Asha Devi, 2009; Valko y col., 2007). Habría que recordar que algunos metales de transición, como los iones de hierro y cobre, están también relacionados con el estrés oxidativo. Estos metales pueden catalizar la formación de ROS a través de la reacción de Fenton y, por esta razón, la alteración de la homeostasis de estos metales también se ha propuesto como otro factor que contribuye a la aparición del estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas (Carri y col., 2003; Hadzhieva y col., 2013; Su y col., 2015).

Otro factor a tener en cuenta para entender la acción de las ROS es su efecto sobre las membranas celulares. Las membranas de las neuronas son muy ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena lateral lo que las hacen particularmente vulnerables, ya que las ROS

tienen una gran capacidad para atacar los dobles enlaces que conforman estos ácidos grasos. Estas modificaciones causarían daños en el cerebro. Un ejemplo de ello se observa con el HNE, metabolito que se obtiene por degradación de los ácidos grasos y que es muy citotóxico para las neuronas por su capacidad para aumentar los niveles de Ca^{2+} e inactivar los transportadores de glutamato (Fritz y Petersen, 2013). Además, la conducción y la transmisión sináptica dependen del correcto funcionamiento de la membrana, y por tanto, si ésta está dañada no se realizará correctamente. Las mitocondrias, responsables de la síntesis de ATP que tanto necesita nuestro cerebro, son también muy sensibles al estrés oxidativo ya que sus funciones tienen una gran dependencia de la integridad de su membrana. Las mitocondrias además poseen sus propios ADN y ARN que a su vez se pueden dañar por la oxidación de la misma forma que los de la propia célula. También hay que tener en cuenta que en la mitocondria es el lugar donde se genera la mayor cantidad de ROS, y por lo tanto, un desequilibrio en la función mitocondrial produciría estrés oxidativo (Carri y col., 2015). Entre los factores que también hacen que nuestro cerebro sea muy sensible al estrés oxidativo podríamos citar la autooxidación de neurotransmisores, el alto tráfico de Ca^{2+} a través de las membranas, su alto ratio superficie de membrana/volumen citoplasmático o la afectación de la barrera hematoencefálica por parte de las ROS (Hermida-Ameijeiras y col., 2004; González y col., 2002; Pun y col., 2009; Troadec y col., 2001; Vannucci y col., 2001)

2.3.1. La peroxidación lipídica y el hidroperóxido de cumeno.

Los lípidos son moléculas esenciales y con numerosas funciones como la de ser los componentes estructurales de las membranas celulares, funcionar como reserva de energía, mediar en la transducción de señales o incluso de manera indirecta regular la expresión de genes (Ademowo y col., 2017; Elustondo y col., 2017). Además, los lípidos juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis, la proliferación celular, la migración, la inflamación y la adhesión celular (Helkin y col., 2016; Ng y col., 2017). La alteración del metabolismo de estos lípidos está relacionada con muchas enfermedades asociadas a la edad y también con las enfermedades neurodegenerativas (AbouAssi y col., 2017; Helkin y col., 2016).

La oxidación incontrolada de lípidos mediada por ROS es lo que se conoce como LPO. Esta LPO es un proceso biológico muy importante que genera como intermedios lípidos oxidados inestables y productos finales estables. Estos productos de la peroxidación tienen diversos papeles en distintos procesos celulares como el metabolismo celular, la señalización o la supervivencia de la célula (Ademowo y col., 2017; Aufschnaiter y col., 2017). Asimismo, los productos de la LPO pueden reaccionar por sí solos y se clasifican como ácidos hidroxílicos o

aldehídos reactivos (Gaschler y Stockwell, 2017). La LPO es la responsable de los cambios que se dan en las propiedades de algunas moléculas como los fosfolípidos, esenciales para la conformación de la estructura de la membrana celular, y va a afectar a las bicapas lipídicas y a interferir con las funciones intracelulares (Ademowo y col., 2017). La LPO va a provocar cambios en las propiedades biofísicas de las membranas como cambios en la fluidez, lo cual a su vez va a provocar que existan cambios en la conformación de los receptores, la inactivación de proteínas de membrana, el aumento de la permeabilidad al agua y los iones y, en menor medida, a componentes de alto peso molecular. En última instancia la LPO puede provocar la destrucción de la membrana (Ferretti y Bacchetti, 2011; Nam, 2011; Wong-ekkabut y col., 2007). Como las moléculas lipídicas, y los ácidos grasos poliinsaturados en especial, son sensibles a la oxidación causada por las ROS, es en estos ácidos grasos poliinsaturados donde se inicia la cadena de autopropagación de la LPO mediante la transferencia de un electrón y la oxidación del ácido graso más cercano (Ademowo y col., 2017; Halliwell, 2001). En condiciones patológicas asociadas al estrés oxidativo la oxidación de fosfolípidos genera una serie de fosfolípidos fragmentados. Cuando ya se observan los efectos de esta oxidación es probable que ya no se pueda prevenir el daño producido al tejido por la inflamación y el estrés oxidativo (Mauerhofer y col., 2016). Para minimizar los efectos de la acumulación de los peróxidos lipídicos y de aldehídos reactivos y disminuir su acumulación a niveles subtóxicos las células utilizan una red de sustancias antioxidantes y sistemas de detoxificación que se discutirán en el apartado 2.4.

El hidroperóxido de cumeno (HC) es un agente oxidante orgánico estable que tiene el grupo funcional peróxido, -O-O-, en su fórmula molecular, $C_6H_5 - (CH_3)_2 - COOH$ (ver figura 2.6). Este grupo funcional es el responsable de inducir la LPO. El HC penetra en la bicapa lipídica de la membrana causando no solo LPO, sino que también reacciona con los aminoácidos y proteínas (Ayala y col., 2014). En presencia de metales iónicos de transición el HC produce radicales cumoxilo (paso 1 en figura 2.6), que quitan un hidrógeno (H^+) de una molécula lipídica generando así alcohol cumílico y un radical lipídico que reacciona con el oxígeno (O_2) promoviendo la iniciación o la propagación de la LPO (paso 2 en figura 2.6). Los radicales cumoxilo pueden reaccionar también con otras moléculas de HC para producir alcohol cumílico y radicales cumoperoxilo (paso 3 en figura 2.6). Finalmente, el radical cumoperoxilo puede llevarse un hidrógeno del lípido más cercano disponible para producir un nuevo HC y un radical lipídico, que de nuevo puede afectar al ciclo de la LPO (paso 4 en figura 2.6). El radical cumoperoxilo también puede reaccionar con oxígeno para producir un nuevo radical cumoxilo, y así iniciar de nuevo la reacción en cadena (paso 5 en figura 2.6; Ayala y col., 2014).

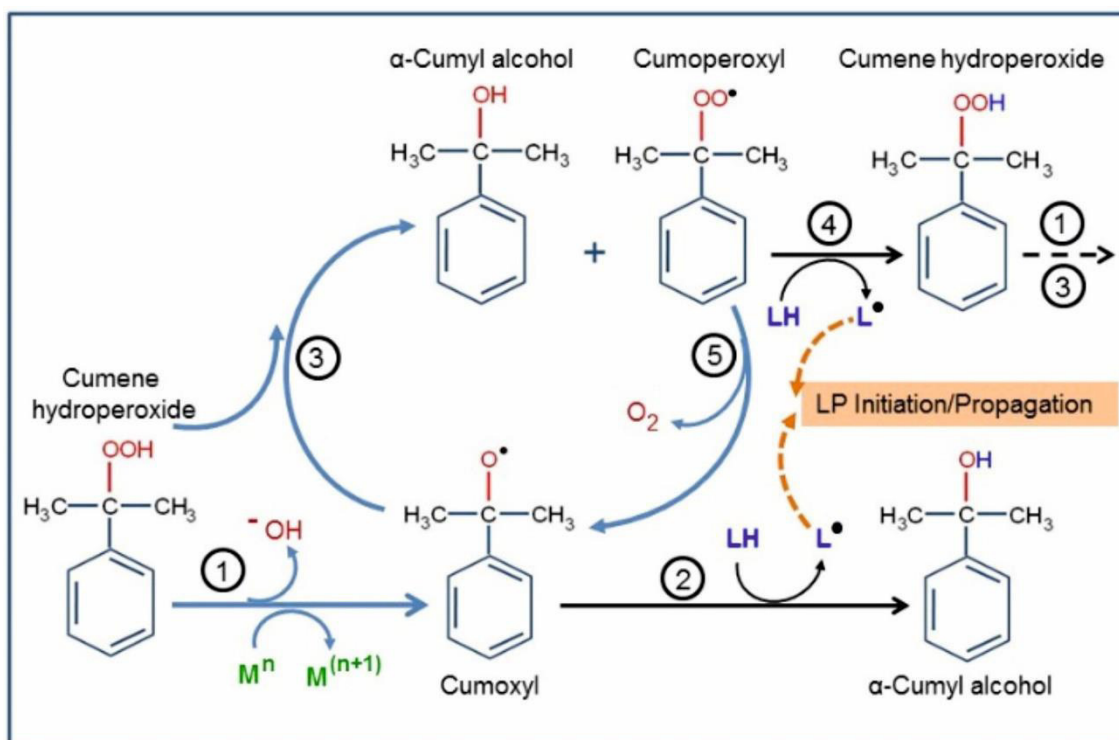


Figura 2.6. Hidroperóxido de cumeno (HC). Esquema que muestra el mecanismo por el cual el HC produce la LPO. LH, molécula lipídica. L•, radical lipídico. Tomado de Ayala y col., 2014.

El HC también puede reaccionar con aminoácidos y proteínas produciendo múltiples efectos, como la oxidación de cadenas laterales, fragmentación, dimerización/agregación, mal plegamiento o cambios conformacionales, inactivación enzimática y alteraciones celulares y proteínicas como lo hace el oxígeno (Davies, 2003; Gracanin y col., 2009).

2.3.2. Estudios electrofisiológicos previos sobre el estrés oxidativo.

Existen pocos estudios acerca del efecto del estrés oxidativo sobre las propiedades eléctricas de membrana. Sin embargo, estos estudios son de gran interés debido a la ya descrita gran vulnerabilidad que presentan los lípidos y proteínas de la membrana neuronal al daño oxidativo. Las evidencias experimentales que podemos encontrar en la bibliografía indican que el efecto de los metabolitos reactivos de oxígeno (radicales libres y H₂O₂) y los agentes oxidantes orgánicos (como el HC) sobre las propiedades de la membrana incluyen cambios en el potencial de membrana, en los gradientes iónicos, en la duración y amplitud de los potenciales de acción, en la actividad espontánea y en la excitabilidad de la célula. A modo de ejemplo, en uno de los artículos publicados por Nani y colaboradores se describe cómo el estrés oxidativo, provocado por la aplicación de H₂O₂, afectó a las propiedades de disparo, el potencial de membrana en

reposo o la resistencia de las neuronas analizadas (Nani y col., 2010; Figura 2.7.A-B). Jovanovic y Jovanovic, por otro lado, mostraron que la exposición de células nerviosas de Retzius de sanguijuelas al HC produjo la alteración de las propiedades del potencial de acción, provocando que la duración aumentara tras la administración del oxidante (Jovanovic y Jovanovic, 2013). Además, en motoneuronas del hipogloso, Nani y colaboradores demostraron que el estrés oxidativo también afectó a la transmisión sináptica caracterizada por una disminución significativa de la frecuencia de corrientes postsinápticas espontáneas debido a los cambios que ocurren en la liberación de numerosos neurotransmisores (Nani y col., 2010; Figura 2.7.C). Adicionalmente, se ha demostrado que la aplicación de peróxido de hidrógeno disminuyó la inhibición sináptica en las neuronas corticales (Frantseva y col., 1998).

2.4. Antioxidantes.

Dada la presencia ubicua de bajos niveles de ROS en todas las células que respiran, y la exposición a altos niveles de ROS en otras situaciones, las células han desarrollado numerosos mecanismos protectores frente al estrés oxidativo. Las neuronas, al igual que la mayoría de las células, tienen diversos mecanismos defensivos frente al daño oxidativo que se pueden clasificar en: i) mecanismos que evitan la formación de especies reactivas (antioxidantes), ii) mecanismos que eliminan las especies reactivas mediante su secuestro (depuradores), iii) mecanismos de reparación de las lesiones causadas por los radicales libres (Acuña-Castroviejo y col., 2009).

Un antioxidante es toda molécula que es capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea interaccionando y estabilizando especies reactivas o convirtiendo a éstas en otras más estables y menos reactivas (Blankenberg y col., 2003; Reynolds y col., 2007; Salvador y col., 2003; Sha y col., 2013; Sies, 1986). Las células tienen una extensa batería de antioxidantes como sistema defensivo para mantener limitados los niveles de las especies reactivas (Nordberg y Arner, 2001). Estos antioxidantes pueden dividirse a su vez en enzimáticos y no enzimáticos.

Antioxidantes no enzimáticos. Entre los no enzimáticos el más importante es el glutatión, muy abundante en diversos compartimentos celulares como el citosol, la mitocondria y el núcleo. Esta molécula es un tripéptido conformado por una molécula de cisteína, una de glutamato y una de glicina (Pompella y col., 2003). La capacidad protectora del glutatión se debe a la cisteína, que permite reducir puentes disulfuro. El glutatión reducido (GSH) puede actuar directamente sobre los radicales hidroxilos, sobre el oxígeno molecular, o también puede actuar a través de la acción catalítica de las glutatión peroxidasas y las glutatión S-transferasas sobre el peróxido de hidrógeno o peróxidos lipídicos (Valko y col., 2007).

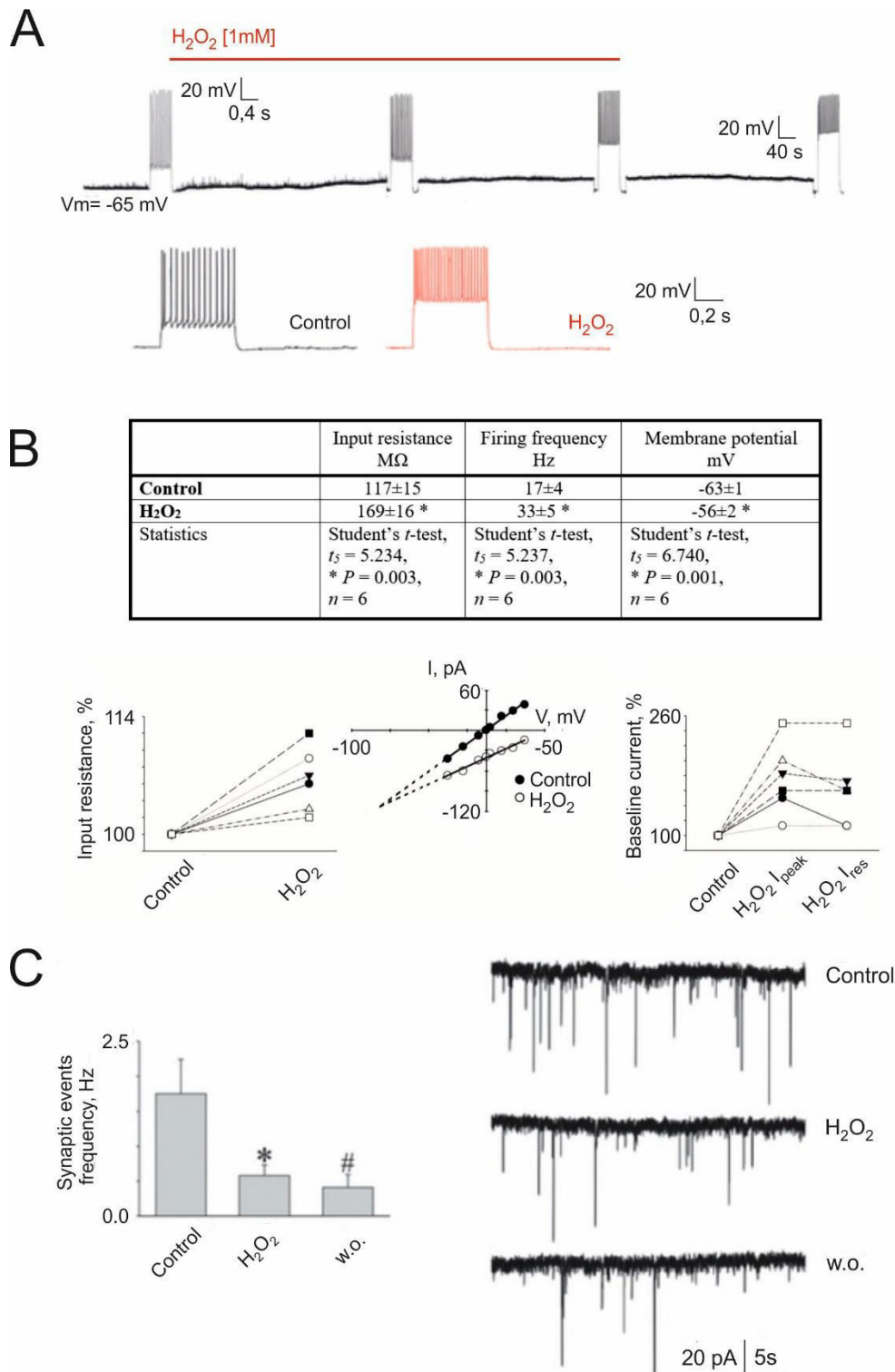
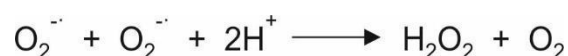


Figura 2.7. Afectación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del hipoglosso por el estrés oxidativo. **A.** Registro que muestra la respuesta en voltaje a pulsos de corriente despolarizantes. Se observa cómo aumenta la frecuencia de disparo de la célula a la vez que se alteran los potenciales de acción. También se observa la despolarización del potencial de membrana. **B.** Cambios en resistencia, frecuencia media de disparo y potencial de membrana provocados por una solución de H₂O₂. En los diagramas se observan los cambios en resistencia y en la corriente de la línea base. Cada línea muestra una neurona. **C.** Disminución de la frecuencia de los eventos sinápticos espontáneos tras la aplicación de H₂O₂. Este efecto no fue reversible incluso tras un lavado prolongado. Modificado de Nani y col., 2010.

Además, el glutatión es el encargado de retirar los aldehídos y junto a las enzimas dismutasas, que explicaremos en el siguiente apartado, forma parte importante de los procesos de detoxificación (Ademowo y col., 2017; Krag, 2011). La relación entre el GSH y la forma oxidada disulfuro del glutatión (GSSG) es la que marca la capacidad antioxidante del glutatión. Otro antioxidante no enzimático es la vitamina C, que protege de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad mediante la transferencia de uno o dos de sus electrones. Cuando realiza su acción puede reducirse de nuevo para comenzar otra vez el ciclo (Linster y Van Schaftingen, 2007). Sin embargo la vitamina C puede actuar como pro-oxidante en algunas circunstancias, como cuando interacciona con hierro libre (Carri y col., 2003). La vitamina E también es un antioxidante no enzimático importante que protege de la oxidación a los lípidos. Al igual que en el caso anterior, la vitamina E puede volver a su forma reducida de forma directa mediante el glutatión o de forma indirecta por la vitamina C (Valko y col., 2007).

Antioxidantes enzimáticos. Entre ellos encontramos las superóxido dismutasas (SOD), catalasas, glutatión peroxidasas o las glutatión reductasas. Las SOD son las responsables de catalizar la siguiente reacción:



Existen tres formas de SOD en humanos denominadas citosólica (Cu/Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) y extracelular (EC-SOD). De estas tres la más interesante para nuestra investigación es la Cu/Zn-SOD o SOD1. Esta enzima está compuesta por dos subunidades idénticas cada una de las cuales tiene en su sitio activo un átomo de Cu y otro de Zn unidos por un residuo de histamina. Estas SOD1 tienen un papel principal en la primera línea de la defensa antioxidante (Battistoni y col., 1998; Casareno y col., 1998; Mates y col., 1999; Stroppolo y col., 1998), y de ahí que mutaciones en el gen que la codifica se hayan identificado, como veremos más adelante, en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Las catalasas son unas enzimas intracelulares que se encuentran principalmente en los peroxisomas y el citosol de la célula, aunque las podemos encontrar también en menor medida en las mitocondrias (Mates y col., 1999). Los niveles de catalasas son bastante bajos en la mayoría de las regiones cerebrales (Valko y col., 2007). Estas enzimas reaccionan con el H_2O_2 de manera eficiente para dar H_2O y O_2 (ver reacción; Mates y col., 1999). También presentan una función

peroxídica ya que provocan la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, el metanol o los fenoles como vemos a continuación (Aebi, 1984; Mates y col., 1999).



Las catalasas no son esenciales para algunos tipos de células pero tienen un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Mates y col., 1999).

Las últimas dos enzimas antioxidantes que vamos a describir están ligadas al glutatión: la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. La glutatión peroxidasa protege a las células del estrés oxidativo catalizando la reducción de hidroperóxidos a través del GSH como vemos en esta reacción (Mates y col., 1999):



Por su parte, la acción de la glutatión reductasa mantiene los niveles de GSH catalizando la reducción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) haciendo que el GSSG pase a GSH. De esta manera se consigue un balance elevado de GSH/GSSG lo que permite que continúe la actividad de la glutatión peroxidasa (Acuña-Castroviejo y col., 2009; Mates y col., 1999).

2.5. Neurodegeneración: mecanismos implicados, implicación del estrés oxidativo y estrategias de neuroprotección.

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías en las que el sistema nervioso se deteriora de manera progresiva e irreversible. Algunas de las enfermedades más importantes de este grupo, tanto por su sintomatología como por el gran impacto que tienen en la población, son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o la ELA. A día de hoy, se desconocen aún muchos aspectos relacionados con el inicio y el desarrollo de las diversas enfermedades neurodegenerativas. Basándonos en los numerosos resultados obtenidos a lo largo de la pasada década y en el amplio estudio de estas enfermedades en la actualidad conocemos un poco más los mecanismos que las desencadenan. Gracias a estos avances hemos podido comprobar de una manera cada vez más evidente que algunos de estos mecanismos son comunes a las diversas patologías neurodegenerativas. Podemos afirmar que la agregación de

proteínas, el daño mitocondrial, la neuroinflamación y el estrés oxidativo y la producción de ROS están involucrados en los procesos de daño neuronal que subyacen en estas patologías neurodegenerativas (Bozzo y col., 2017). Sin embargo, el mecanismo específico responsable de la neurodegeneración aún no se conoce con exactitud (Do-Ha y col., 2017; Jovanovic y Jovanovic, 2013; Martin y col., 2017).

La agregación de proteínas en el SNC es un rasgo compartido por las enfermedades neurodegenerativas. Las proteínas agregadas van a ser específicas para cada enfermedad pero probablemente los mecanismos patogénicos sean comunes. En la enfermedad de Alzheimer se produce la acumulación de β -amiloide y proteínas tau en el cerebro (Hashimoto y col., 2003). Este β -amiloide va a formar depósitos fuera de las neuronas conocidos como placas seniles y la fosforilación de la proteína tau provoca que se formen agregados intraneuronales y pierda su función (Li y col., 2013; Ohnishi y Takano, 2004). En la enfermedad de Parkinson son característicos los cuerpos de Lewy, formados por la agregación de la α -sinucleína y la ubiquitina. La acumulación de esta α -sinucleína va a provocar la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Xiang y col., 2013). Cuando se desarrolla la enfermedad de Huntington una de las dos copias que tenemos los humanos del gen huntingtina genera una proteína huntingtina mutante que es propensa a formar agregados (Li y col., 2013). En la ELA se producen unas inclusiones proteicas en los somas y axones de las neuronas motoras que van a provocar, en última instancia, la destrucción de estas células. Estas inclusiones suelen contener ubiquitina y alguna de las proteínas asociadas comúnmente a la ELA como la SOD1, TDP-43 o FUS (Deng y col., 2011, 2014; Li y col., 2013).

Numerosos estudios muestran que la disfunción mitocondrial está involucrada en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas (Bhat y col., 2015). Las mitocondrias son orgánulos que se encuentran en las células eucariotas y que son muy importantes en numerosos procesos celulares como la síntesis de ATP y de determinados metabolitos, la homeostasis del Ca^{2+} , la producción de ROS o la apoptosis. Estos orgánulos son muy dinámicos y están continuamente en fusión, fisión y transporte (Gao y col., 2017). Las mitocondrias tienen una gran cantidad de enzimas redox que participan en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria y si se produce alguna alteración en este proceso va a conllevar la generación de ROS. Debido al exceso de estas ROS y mutaciones ambientales del ADN mitocondrial se puede producir un fallo energético que repercute en el inicio de las enfermedades neurodegenerativas (Bhat y col., 2015). Hirai y colaboradores en 2001 fueron los pioneros en encontrar en la enfermedad de Alzheimer cambios morfológicos en las mitocondrias, ya que estas se encontraban fragmentadas

y con daños en la estructura de su membrana (Gao y col., 2017; Hirai y col., 2001). Además, se ha descrito que las β -amiloides, que hemos descrito antes, pueden acumularse en las mitocondrias e interactuar con diversas proteínas provocando la disfunción de la mitocondria (Du y col., 2008). La enfermedad de Parkinson y la de Huntington también se relacionan con la disfunción mitocondrial ya que las neuronas de la *substancia nigra* acumulan numerosas delecciones en el ADN mitocondrial (Gasser, 2007) y la huntingtina mutada puede asociarse con la mitocondria y provocar alteraciones en sus funciones, así como producir su fragmentación o la disminución de los niveles de ATP (Wang y col., 2009).

Las enfermedades neurodegenerativas también están relacionadas con la pérdida de la regulación de la respuesta inflamatoria en el tejido cerebral (Aguilera y col., 2017). En el cerebro se producen procesos inflamatorios cuando por culpa de una infección las células inmunes atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan para combatirla. Además, en el tejido cerebral hay varios tipos celulares que expresan unos receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones, que localizan proteínas mal plegadas, ácidos nucleicos dañados o péptidos agregados y cuando lo hacen activan vías de señalización que van a provocar una inflamación. Por otro lado, la inflamación en el tejido cerebral puede desencadenarse por la activación de algún tipo celular como la microglía, los astrocitos o las neuronas. Todas ellas tienen receptores para citoquinas y otros mediadores de la inflamación, participando así en la regulación de la respuesta inflamatoria en el cerebro (Aguilera y col., 2017; Heneka y col., 2014, 2015).

El estrés oxidativo es otro de los grandes mecanismos asociados a la aparición de alguna de las enfermedades neurodegenerativas, ya sea por sí solo o desencadenado por la inflamación. Se ha descrito que la activación de la microglía tiene cierta relación con el estrés oxidativo ya que esta activación viene acompañada de la formación de ROS, las cuales son utilizadas por las células como primera defensa contra los patógenos. Las ROS a su vez hacen que aumente la activación de la microglía convirtiendo el proceso en un ciclo que se retroalimenta. Además, con esta activación se produce la atracción de los macrófagos que se infiltran en el tejido y provocan una mayor inflamación (Leszek y col., 2016). Las ROS tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria ya que intervienen en distintos mecanismos, como ejercer de mediadores de la activación de linfocitos T o intervenir en los procesos de migración y adhesión celular (Aguilera y col., 2017). Todos estos datos muestran la estrecha relación que existe entre la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo y de ahí que la alteración de alguno de estos procesos pueda derivar en un daño celular en el SNC.

Existe la posibilidad que el estrés oxidativo esté también relacionado con la agregación de proteínas (Salim, 2017). Algunos estudios como los de Li y colaboradores muestran cómo las ROS pueden intervenir en la formación de las placas seniles, la agregación de huntingtina mutante o de α -sinucleína (Li y col., 2013). Asimismo, existen estudios que muestran que la formación de estos agregados proteicos puede generar a su vez la aparición de más ROS. Esto puede ocurrir por la agregación de β -amiloide o de la α -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas (Shelat y col., 2008; Xiang y col., 2013). Esta producción excesiva de ROS, derivada de la agregación de β -amiloide, puede provocar la LPO que provoca a su vez la alteración de la permeabilidad de la membrana activándose así mecanismos excitotóxicos relacionados con el aumento del flujo de Ca^{2+} . Además, estos mecanismos pueden alterar la neurotransmisión y por tanto comprometer el normal funcionamiento neuronal (Salim, 2017).

En los siguientes apartados nos centraremos en las evidencias que existen sobre la implicación del estrés oxidativo en la etiopatogenia de la ELA y estudiaremos las posibles estrategias de neuroprotección que se puedan llevar a cabo. Dentro de estas estrategias hablaremos de la melatonina y sus posibilidades para ser un agente neuroprotector o incluso ser una posible estrategia terapéutica en el tratamiento de dicha enfermedad.

2.5.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica e implicación del estrés oxidativo.

La ELA es una enfermedad fatal resultante de la degeneración de las motoneuronas superiores e inferiores, incluyendo las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora las cuales regulan el control voluntario de los movimientos (Mochizuki y col., 2011). El primero en observar esta patología fue Charles Bell en el año 1830, pero fue el neurólogo Dr. Jean-Martin Charcot quien describió la enfermedad al completo y le puso nombre (Mathis y col., 2017). Charcot describió la ELA como una patología esporádica del adulto, resultado de la degeneración progresiva del sistema motor, abarcando a las motoneuronas superiores, inferiores y sus distintas proyecciones en los troncos nerviosos periféricos. Todo esto conlleva una debilidad y atrofia muscular general, progresiva y rápida que frecuentemente acaba en la muerte del paciente (Charcot y Joffroy, 1869). Charcot utilizó el término ELA para referirse a esta enfermedad por primera vez en el año 1874. Este término hace referencia al endurecimiento que puede notarse en la autopsia de los pacientes de las columnas laterales de la médula espinal y la atrofia muscular generalizada. La ELA está incluida en la clasificación de las enfermedades de la neurona motora tras la descripción que hicieron de ella Brain y Walton en 1969 (Rowland, 2001).

La degeneración de las neuronas motoras superiores es la causa de la aparición de la espasticidad, hiperreflejos y además compromete el control motor, mientras que la degeneración de las motoneuronas inferiores se caracteriza por una debilidad muscular y muerte celular (Boillée y col., 2006; Kim y col., 2014). Se trata de una enfermedad actualmente incurable que conlleva la muerte del paciente en un periodo de 3 a 5 años tras su diagnóstico. Este fallecimiento suele estar causado por una insuficiencia respiratoria. A pesar de este pronóstico tan desfavorable, hay una variación considerable en la tasa de supervivencia y más de un 10% de los pacientes de ELA superan los 8 años de vida desde la aparición de los primeros síntomas (Martin y col., 2017). En esta enfermedad se ven afectadas la comunicación oral, la deglución, la respiración y la autonomía motora. Además, esta enfermedad se caracteriza por llevar asociada una parálisis muscular que deriva en una incapacidad completa del individuo, aunque no se ven afectadas la sensibilidad, la motilidad ocular, el control de los esfínteres ni las funciones mentales.

Existen numerosos estudios epidemiológicos que hablan de una incidencia que oscila entre los 1-2 casos por cada 100.000 habitantes al año (Martin y col., 2017). Esta incidencia es algo superior en determinadas zonas como la isla de Guam, la península de Kii, la tribu Anguru o la población de la isla de Guadalupe en el Caribe (Camacho y col., 2015). La prevalencia de esta patología es baja ya que trae asociada una alta tasa de mortalidad. La edad media a la que comienza esta enfermedad suele estar entre los 55 y los 65 años, aunque en el caso de la ELA hereditaria el inicio es a edades más tempranas. Además, esta patología es un poco más frecuente en hombres que en mujeres (Camacho y col., 2015), con un ratio aproximado hombre:mujer de 3:2 (Martin y col., 2017). Para conseguir una mayor homogeneidad en el diagnóstico y en el reclutamiento de pacientes para estudios clínicos, en 1990 la Federación Mundial de Neurología se reunió en El Escorial (Madrid) para establecer unos criterios diagnósticos basados en la presencia de determinados signos clínicos conocidos como “Criterios de El Escorial”. Estos criterios se han reevaluado en varias ocasiones, la última de ellas por Brooks en el año 2000. En el año 2008 se decide cambiar los “Criterios de El Escorial” por otros conocidos como “Criterios de Awaji”. Estos criterios se basan en el uso de técnicas y registros electrofisiológicos para diagnosticar la presencia de ELA en un paciente (de Carvalho y col., 2008). Estos nuevos criterios presentan la misma especificidad, pero mayor sensibilidad, que los usados anteriormente (Mathis y col., 2017; Tabla 2.1).

CATEGORÍA DIAGNÓSTICA	Descripción
ELA Clínicamente Definitiva	Definida por la evidencia clínica o electrofisiológica de la presencia de signos tanto de neurona motora inferior como superior en la región bulbar y al menos en 2 regiones espinales o la presencia de signos de neurona motora inferior y superior en 3 regiones espinales
ELA Clínicamente Probable	Definida por la evidencia clínica o electrofisiológica de la presencia de signos de neurona motora inferior y superior en al menos 2 regiones con algunos signos de neurona motora superior necesariamente en la región rostral a los signos de neurona motora inferior. Los Criterios de El Escorial tienen otra categoría adicional llamada "ELA Probable apoyada por el laboratorio", definida cuando se encuentran signos de disfunción de la neurona motora inferior y superior en 1 sola región pero existen signos electrofisiológicos de pérdida de la neurona motora inferior en 2 o más regiones.
ELA Clínicamente Posible	Definida por la evidencia clínica o electrofisiológica de signos de disfunción de neurona motora inferior y superior en 1 sola región o la aparición de signos únicamente de neurona motora superior en dos o más regiones o se encuentran signos de neurona motora inferior en una zona rostral respecto a los signos de neurona motora superior.

Tabla 2.1. Criterios revisados de El Escorial para el diagnóstico de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) con el algoritmo electrodiagnóstico de Awaji incluido. Modificado de Costa y col., 2012.

Aproximadamente en un 5-10% de los casos el origen de la ELA tiene un componente genético. Podemos decir que hay tres genes que tienen un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. El primero de ellos es el gen de la SOD1, que se identificó por primera vez en el año 1993. La proteína de SOD1 es un secuestrador de radicales libres cuya pérdida de su función conlleva un incremento del daño celular causado por estos radicales libres. Los ratones transgénicos *knock out* de SOD1 desarrollan una degeneración de las neuronas motoras y, por esta razón, se utilizan como modelo de la enfermedad (Martin y col., 2017). Se han encontrado mutaciones en el gen SOD1 (Cu/Zn SOD1 citosólico) en aproximadamente un 20% de los individuos que presentan esta forma de ELA familiar (Synofzik y col., 2012). El segundo gen importante es el TAR-DBP, que codifica la proteína TDP-43, la cual está involucrada en la regulación de la expresión de ARN. Por último, el tercer gen con un papel importante relacionado con la ELA es el gen *C9orf72*, encargado de regular el tráfico de endosomas y la autofagia en neuronas, el cual presenta una expansión masiva de un hexanucleótido en el intrón 1 (Martin y col., 2017). Sin embargo, en el 90% de los casos la ELA es esporádica y la causa inicial todavía es desconocida. La degeneración de las motoneuronas en la ELA esporádica puede ser consecuencia de una combinación de mecanismos que incluyen la excitotoxicidad, que provoca disfunciones

mitocondriales y disregulación de la homeostasis del Ca^{2+} , la agregación aberrante de proteínas, neuroinflamación, alteración de los canales iónicos y de la excitabilidad y toxicidad ambiental (Cleveland y Rothstein, 2001; Foran y Trotti, 2009; Grosskreutz y col., 2007; Guatteo y col., 2007; Martorana y col., 2012; Philips y Robberecht, 2011; Pieri y col., 2013, 2009; Saba y col., 2016; Van Den Bosch y col., 2006; Yin y col., 2017; Zona y col., 2006; Figura 2.8). También se cree ampliamente que el estrés oxidativo tiene un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad (Niedzielska y col., 2016; Poppe y col., 2014; Reynolds y col., 2007; Figura 2.8).

Numerosas evidencias muestran que el estrés oxidativo, causado por la participación a diferentes niveles de ROS, en particular peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) o peroxinitritos, contribuye en gran medida a la degeneración neuronal y de ahí que pueda ser

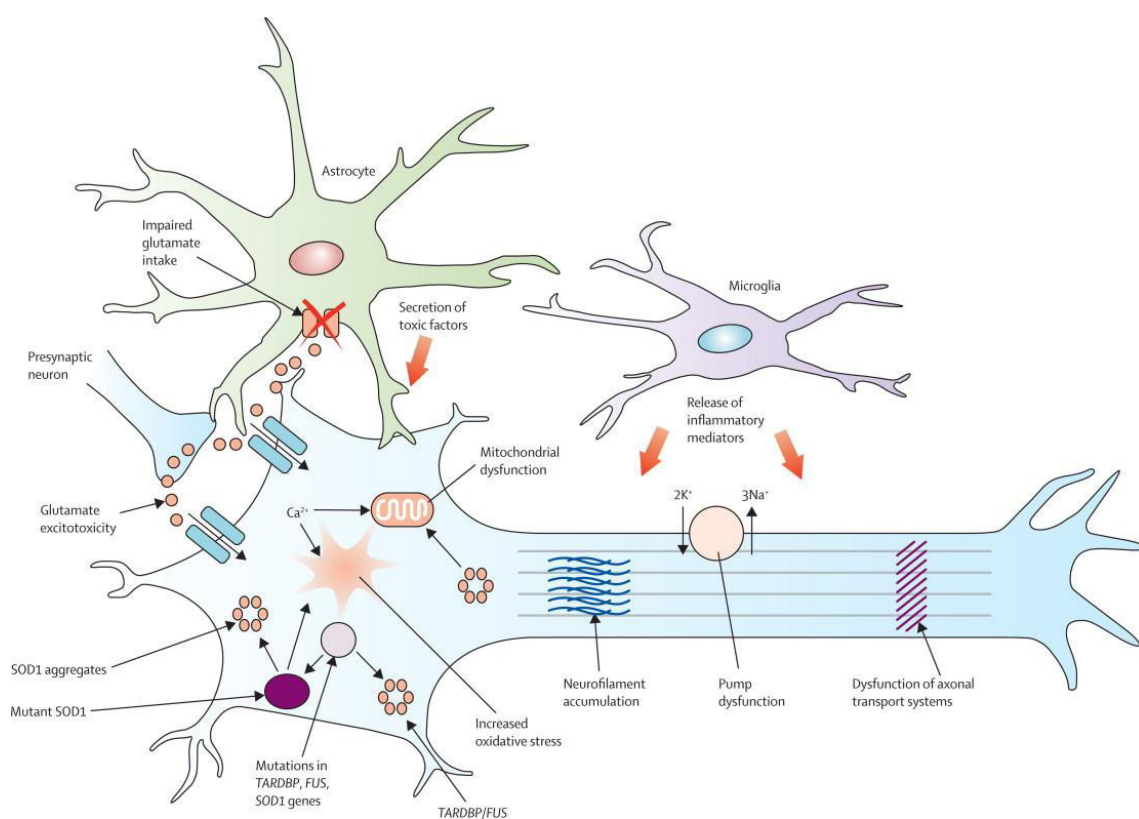


Figura 2.8. Posibles mecanismos implicados en la neurodegeneración de la ELA. En esta figura podemos observar un resumen de los distintos procesos que pueden provocar la neurodegeneración que se observa en la ELA. Entre estos mecanismos encontramos la excitotoxicidad por glutamato, la disfunción mitocondrial, la agregación de proteínas, el aumento del estrés oxidativo, la neuroinflamación o factores genéticos. Tomado de Kiernan y col., 2011.

uno de los factores en el desarrollo de la ELA (Figura 2.8; Cleveland y Rothstein, 2001; Reynolds y col., 2007). De hecho, un estudio clínico reciente demostró que la magnitud de estrés oxidativo se correlaciona bien con la severidad clínica de los pacientes con ELA (Ikawa y col., 2015).

Algunas de las proteínas que se consideran importantes en la patogénesis de la ELA como SOD1 y TDP-43 pueden causar la pérdida de funciones de la mitocondria afectando a la expresión de proteínas mitocondriales (Turner y col., 2013). Por ejemplo, la SOD1 mutante puede afectar a varios componentes importantes de la mitocondria como los canales voltaje dependientes de aniones (Israelson y col., 2010) o las proteínas antiapoptóticas Bcl2 (Pedrini y col., 2010). Otro hecho importante es que debido al daño que provoca la SOD1 mutante las mitocondrias no se encuentran distribuidas de manera homogénea a lo largo de los axones de las neuronas motoras (Vande Velde y col., 2011). Por otra parte la agregación aberrante de proteínas y su mal plegamiento es otro signo importante en la ELA (Figura 2.8). Los mecanismos por los que se produce son desconocidos, pero se sabe que el estrés oxidativo y la desregulación del estado *redox* afecta a la conformación de las proteínas y su estructura. La oxidación de los grupos tiólicos de las proteínas crea unos puentes disulfuro aberrantes los cuales alteran la estructura proteica y provoca el mal plegamiento (Dormann y col., 2010; Parakh y col., 2013). Según los resultados obtenidos por Philips y Robberecht en 2011, la neuroinflamación es otro de los mecanismos que pueden estar implicados en la patogénesis de la ELA (Figura 2.8). Existen diversos estudios con pacientes de ELA que confirman este hecho ya que se han encontrado niveles elevados de marcadores de inflamación como la proteína C reactiva, las interleucina-6 y 13 o la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (Turner y col., 2013).

La alteración del metabolismo energético y los factores ambientales también son mecanismos a tener en cuenta al hablar de la patogénesis de la ELA. Existen estudios que han demostrado que el balance energético de todo el cuerpo se ve afectado en la ELA, lo que contribuiría a la neurodegeneración de las neuronas motoras (Dupuis y col., 2011, 2004). Otros indicadores como el índice de masa corporal, el estado nutricional general o los lípidos circulantes en sangre están relacionados con un pronóstico de supervivencia favorable (Dupuis y col., 2008; Marin y col., 2011). En cuanto a los factores ambientales no hay nada concluyente. Se estima que el uso por parte de los habitantes de las islas del Pacífico Sur de una planta llamada *Cycas circinalis* como alimento o medicina puede estar relacionado con la alta incidencia de la zona (Bailey-Wilson y col., 1993). Esta enfermedad neurodegenerativa se ha relacionado con elevados niveles ambientales de aluminio (Guiroy y col., 1987). Por otra parte, algunos estudios clínicos muestran

que los combatientes que participaron en la Guerra del Golfo presentan el doble de probabilidades de padecer ELA esporádica que el resto de la población (Smith y col., 2000).

Otro factor importante con el que se ha relacionado la ELA es la presencia de elevados niveles de excitotoxicidad por glutamato (Figura 2.8). El aumento de la liberación de glutamato desde las terminaciones presinápticas puede inducir excitotoxicidad en las motoneuronas tanto superiores como inferiores (King y col., 2016; Maekawa y col., 2004). Al mismo tiempo puede proponerse que el aumento del glutamato pueda deberse a la alteración de la actividad de los astrocitos, ya que se encargan de la regulación de la recaptación de neurotransmisores del espacio sináptico (Do-Ha y col., 2017). Una activación excesiva de los receptores de glutamato puede inducir la cascada de excitotoxicidad (Spalloni y col., 2013). Esta excitotoxicidad puede producir la muerte neuronal por el aumento del flujo de Ca^{2+} , el cual produce la activación de determinadas enzimas, así como la pérdida de funciones en la mitocondria (Van den Bosch y col., 2006). La desregulación del metabolismo del glutamato y de su eliminación se demuestra por el aumento de los niveles de glutamato que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de ELA (Rothstein y col., 1990). Por otra parte, el análisis post-mortem de la expresión de los transportadores de glutamato, encargados de eliminar el glutamato del espacio sináptico, muestra una disminución de los transportadores aminoácidos excitadores EAAT1 y EAAT2 que se expresan de forma específica en los astrocitos (Rothstein y col., 1995). En ratones SOD1 mutantes también se ha encontrado afectaciones del transportador EAAT2 en los astrocitos, lo que explicaría la mayor vulnerabilidad de las neuronas a la excitotoxicidad (Pardo y col., 2006).

Durante esta investigación vamos a estudiar el papel que desempeña el estrés oxidativo en el daño de las neuronas de la corteza motora. El interés en estudiar el estrés oxidativo surge cuando se descubre que una mutación en el gen SOD1, y que como ya hemos mencionado codifica una de las enzimas antioxidantes más importantes de nuestro organismo, se encuentra aproximadamente en el 20% de los casos de ELA familiar (Barber y Shaw, 2010). Un hecho interesante es que la propia SOD1 es susceptible a la oxidación (Turner y col., 2013). Estudios post-mortem en humanos han demostrado que hay indicadores bioquímicos que muestran que se produce un amplio daño de los lípidos, proteínas y ADN debidos al estrés oxidativo (Bogdanov y col., 2000), además de cambios en vías de señalización sensibles al estado *redox* (Turner y col., 2013) relacionados con casos tanto de ELA esporádica como asociada a mutaciones en SOD1. A parte de estos indicadores se han encontrado numerosos marcadores potenciales de estrés oxidativo al analizar el LCR y la sangre de pacientes de ELA (Turner y col., 2009). También se han encontrado evidencias de daño oxidativo en el ARN y alteraciones en el procesamiento del ARNm

en la fisiopatología de la ELA (Chang y col., 2008). Por otra parte, otro factor que relaciona el estrés oxidativo con la aparición de la ELA es la alteración del factor de transcripción Nrf2. Este factor es un regulador de la respuesta antioxidante y reacciona al estrés oxidativo uniéndose y aumentando la regulación de los genes que codifican elementos de la respuesta antioxidante (Turner y col., 2013). Evidencias relativamente recientes muestran cómo el Nrf2 se encuentra alterado en modelos de ELA con mutantes SOD1 y en el SNC de pacientes de ELA (Sarlette y col., 2008). Con estos datos queda claro que la ELA, y las enfermedades neurodegenerativas en general, tiene una fisiopatología muy compleja en la cual el estrés oxidativo puede representar un factor común en la degeneración de las neuronas motoras (Carri y col., 2015).

Un signo muy importante en la patología de la ELA es la hiperexcitabilidad cortical. En términos electrofisiológicos la hiperexcitabilidad se describe como un aumento o una respuesta exagerada a un estímulo (Do-Ha y col., 2017). Diversos estudios con estimulación magnética transcraneal han demostrado que se da una hiperexcitabilidad cortical en pacientes con ELA, la cual se detecta antes del comienzo de los síntomas de la enfermedad y que es un factor común a los distintos tipos de ELA familiar debida a mutaciones en SOD1, FUS o C9orf72 (Do-Ha y col., 2017; Vucic y col., 2011, 2008). Además de en la ELA familiar la hiperexcitabilidad también se ha observado en diversos estudios realizados en ELA esporádica (Vucic y col., 2008; Williams y col., 2013). De estos descubrimientos se ha propuesto que la degeneración de las motoneuronas en la ELA puede ser el resultado de esta hiperexcitabilidad cortical. No se conocen los mecanismos exactos que provocan la hiperexcitabilidad pero se han propuesto cinco como posibles candidatos: la interrupción de la inhibición cortical, la disfunción iónica, la desregulación de la homeostasis del K^+ , la excitotoxicidad por glutamato y el estrés oxidativo (Geevasinga y col., 2014; King y col., 2016).

Hay evidencias de que la interrupción de la inhibición cortical es un desencadenante de la hiperexcitabilidad cortical (Geevasinga y col., 2014). La mayoría de las interneuronas de la corteza son inhibitoras y utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina como neurotransmisores. Las interneuronas GABAérgicas son las que juegan el papel más importante en la regulación de la excitabilidad cortical (Do-Ha y col., 2017). Un estímulo por debajo del nivel umbral en un individuo sano va a conllevar la activación de las interneuronas inhibitoras GABAérgicas reduciendo así la excitabilidad de las neuronas piramidales (Wagle-Shukla y col., 2009). Diversos estudios han relacionado la interrupción de la inhibición cortical con la hiperactividad de cierto tipo de interneuronas en modelos de ratón TDP-43, la desregulación de los genes que codifican para las subunidades α de los receptores de GABA o con la afectación de

corrientes inhibitoras mediadas por receptores GABA en ratones *wobbler* (Do-Ha y col., 2017; Moser y col., 2013; Petri y col., 2003). Todos estos resultados muestran una importante desregulación en la señalización GABAérgica, tanto en modelos animales como en tejidos post-mortem de pacientes de ELA. No obstante, todavía faltan por conocer los mecanismos concretos que subyacen a esta hiperexcitabilidad. Por tanto, para explicar la hiperexcitabilidad cortical se necesitaría una caracterización más precisa para determinar si hay un incremento de la transmisión excitadora o una interrupción de la inhibición, y si ésta contribuye a la excitotoxicidad en las motoneuronas en la ELA.

Un hecho importante es que el comienzo de la ELA no tiene un patrón clínico definido y se caracteriza por una amplia variabilidad clínica. Esto, sumado a la falta de una prueba de diagnóstico eficiente y a la ausencia de biomarcadores, hace muy complejo un diagnóstico precoz (Caballero-Hernandez y col., 2016). La identificación de biomarcadores ayudaría a evitar el retraso en el diagnóstico de la enfermedad, que actualmente se encuentra entre 10 y 12 meses, y por tanto del desarrollo de terapias eficaces contra esta enfermedad (Mathis y col., 2017; Turner y col., 2013). En la búsqueda de estos biomarcadores se están realizando estudios de proteómica en los biofluidos y en las biopsias de distintos tejidos. Entre los biofluidos usados en los distintos ensayos para identificar biomarcadores podemos citar el LCR, la sangre, la orina o la saliva. La sangre, aunque es bastante accesible, tiene una gran complejidad proteica y las proteínas que intervienen en la función neuronal se encuentran en una concentración mucho menor que en el LCR. Por su parte, el LCR es un excelente candidato ya que se encuentra muy próximo a las regiones que muestran muerte celular durante la ELA (Turner y col. 2013). De ahí que durante la década pasada se haya producido un aumento de los estudios que utilizan el LCR como posible fuente de biomarcadores. Más recientemente se ha empezado a utilizar la espectrometría de masa para identificar a estos posibles candidatos (Mitchell y col., 2009; Ryberg and Bowser, 2008; Turner y col., 2013). Los posibles biomarcadores que se encuentran en el LCR pueden dividirse en dos grupos: aquellos que reflejen la pérdida neuronal y los que indiquen procesos de neuroinflamación. Estos biomarcadores del LCR además de ser útiles para ayudar en el diagnóstico de la ELA, podrían servir para monitorizar los efectos de las terapias farmacológicas o como indicadores del pronóstico de la enfermedad (Sussmuth y col., 2010; Turner y col., 2013; Wilson y col., 2010). Otras fuentes interesantes de biomarcadores pueden ser el músculo esquelético (ya que es uno de los más afectados por la enfermedad y es accesible fácilmente para poder biopsiarlo), la piel, tejidos post-mortem o el uso de distintas técnicas neurofisiológicas como la electromiografía, la estimulación magnética transcraneal, la miografía de impedancia eléctrica o técnicas de neuroimagen, o los estudios de excitabilidad neuronal cortical (Mathis y

col., 2017). Entre los últimos descubrimientos en este campo de los biomarcadores están los microARN (miARN). Estas moléculas de miARN están presentes en los fluidos corporales humanos de una manera notablemente estable (Gallego y col., 2012; Mitchell y col., 2009) y nos revelan información sobre los cambios que ocurren en las células de las que provienen, entre ellas las neuronas, por lo que los miARN detectados en el LCR nos darán información sobre las condiciones fisiológicas y patológicas del cerebro (Benigni y col., 2016). En algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple se han estudiado los niveles de estos miARN con resultados prometedores (Burgos y col., 2014; Denk y col., 2015).

2.5.2. Estrategias de neuroprotección en la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

Actualmente no existe cura para la ELA y por el momento ningún tratamiento ha demostrado ser eficaz. A día de hoy, el único medicamento que se utiliza de forma habitual como terapia farmacológica y que ha probado tener un efecto discreto en la supervivencia a la ELA es el riluzol (Ajroud-Driss y Siddique, 2015; Mathis y col., 2017). Este fármaco es un derivado del benzotiazol y ha mostrado tener un efecto neuroprotector leve en los pacientes de ELA. La administración oral diaria de 100 mg de riluzol eleva hasta un 15% la probabilidad de sobrevivir durante un año y tras 18 meses de tratamiento prolonga la supervivencia durante 3 meses (Geevasinga y col., 2016; Mathis y col., 2017). Los mecanismos por los que el riluzol produce su efecto neuroprotector parecen complejos y aún no se conocen completamente. La acción más conocida de este fármaco es la capacidad de antagonizar la excitotoxicidad por glutamato, es decir como agente antiglutamatérgico (Geevasinga y col., 2016). Estos efectos antiglutamatérgicos los lleva a cabo mediante diversos mecanismos como la inhibición de la liberación de glutamato desde las terminaciones pre-sinápticas, aumentando la recaptación del glutamato por parte de los astrocitos o antagonizando los receptores inotrópicos de glutamato (Azbill y col., 2000; Do-Ha y col., 2017; Dunlop y col., 2003). Además de estos efectos relacionados con el glutamato, el riluzol también actúa sobre las funciones de los canales de Na^+ . Este fármaco inhibe las corrientes persistentes y transitorias de Na^+ aunque en pacientes de ELA solo reduce las transitorias sin afectar a las persistentes (Do-Ha y col., 2017; Geevasinga y col., 2016).

Los resultados obtenidos con este tratamiento son esperanzadores, pero como hemos comentado los efectos son todavía muy discretos y hay que realizar mejores aproximaciones terapéuticas probando nuevas terapias o combinaciones de ellos. Por esta razón, recientemente se ha empezado a investigar la posibilidad de usar sustancias antioxidantes como terapia en la ELA ya que, como hemos comentado anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los mecanismos que podrían estar relacionados con la patogénesis de la enfermedad. Uno de estos antioxidantes

con los que se trabaja actualmente es la melatonina. La melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine; Figura 2.9.A) es una hormona natural sintetizada en la glándula pineal a partir del triptófano. Una vez sintetizada, la melatonina no se almacena en la glándula pineal sino que difunde hacia la sangre capilar y el LCR (Tan y col., 2007; Figura 2.9.B). Esta melatonina se secreta siguiendo un ciclo circadiano y alcanza su pico máximo por la noche ya que la luz solar provoca la inhibición de su síntesis (Figura 2.9.A). Además de la glándula pineal, otros órganos o células tienen la capacidad de sintetizar melatonina, como por ejemplo, el tracto gastrointestinal, los leucocitos, la médula ósea o algunas áreas del SNC (Hardeland, 2008; Jimenez-Jorge y col., 2007). En la mayoría de estos lugares la melatonina se libera en poca cantidad o dicha liberación está supeditada a condiciones específicas. Un factor a tener en cuenta es el hecho de que la melatonina es una molécula anfipática, por lo que puede atravesar todas las barreras biológicas del organismo. Por esto, las mitocondrias son capaces de captar melatonina de forma activa de una manera dosis y tiempo dependiente (Acuña-Castroviejo y col., 2009) protegiéndose del estrés oxidativo en el mismo momento en que se produce.

La melatonina participa en diversas funciones corporales entre las que podemos incluir el sueño, la regulación del ciclo circadiano o la inmunorregulación (Pandi-Perumal y col., 2006). Además, la melatonina es un potente secuestrador de radicales libres (hidroxilo, carbonato y varios radicales orgánicos, así como numerosas RNS) y actúa como regulador de enzimas *redox* (Galano y col., 2011). La melatonina también puede aumentar el potencial antioxidante de las células ya que estimula la síntesis de enzimas antioxidantes como las SOD, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Pandi-Perumal y col., 2013). En comparación con otras sustancias antioxidantes como la vitamina C y E o la N-acetilcisteína, la melatonina ha demostrado tener un mayor efecto protector contra el estrés oxidativo y más eficacia como secuestrador de radicales libres, incluso cuando estos otros antioxidantes se usaron en concentraciones 10.000 veces superiores (Acuña-Castroviejo y col., 2009; Galano y col., 2011). Además, puede potenciar los efectos de otros antioxidantes como la vitamina C y el NADH (Pandi-Perumal y col., 2013).

El mecanismo de acción por el que la melatonina realiza su acción antioxidante está basada en su gran capacidad para donar un electrón gracias a su alto potencial *redox* y a la capacidad de donar un átomo de hidrógeno al NH de su anillo pirrólico para generar un radical el

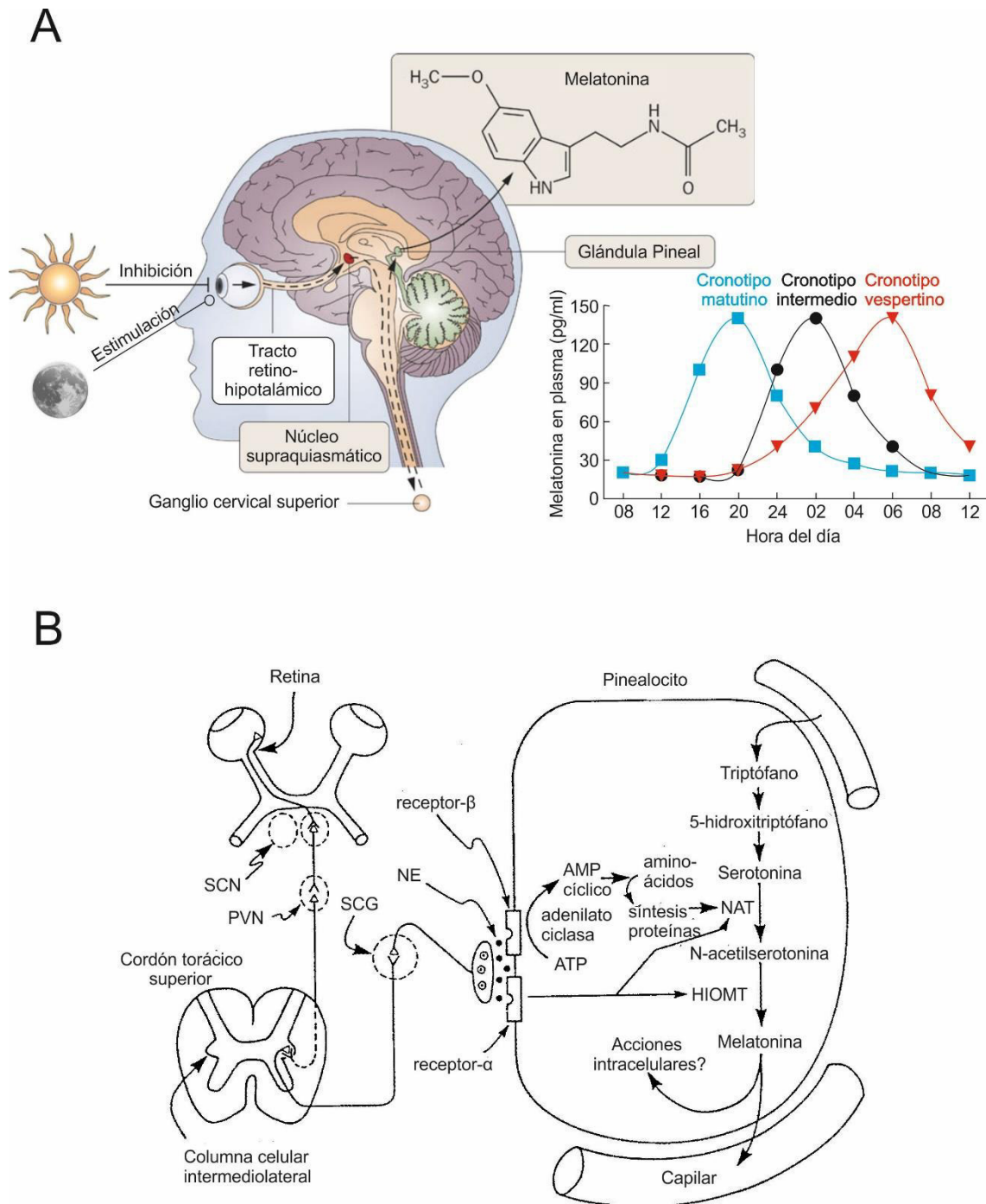


Figura 2.9. Melatonina. A. Fórmula estructural de la melatonina y ciclo de inhibición/estimulación en la síntesis de melatonina. Modificado de Koch y col., 2009; Escames y Acuña-Castroviejo, 2009. **B.** Vías implicadas en la estimulación y síntesis de la melatonina. Esquema que muestra la ruta de síntesis de la melatonina en la glándula pineal. Abreviaturas: SCN, núcleo supraquiasmático; PVN, núcleo paraventricular; SCG, ganglio cervical superior; NE, norepinefrina o noradrenalina; NAT, Nacetiltransferasa; HIOMT, hidroxindol-O-metiltransferasa. Modificado de Reiter, 1994.

cual puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ para producir N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinurenamina y N^1 -acetil-5-metoxiquinurenamina. Estos últimos son a su vez antioxidantes y conforman con la melatonina la cascada antioxidante (Acuña-Castroviejo y col., 2009; Tan y col., 2007).

La melatonina se utiliza en clínica como fármaco desde hace muchos años debido a su seguridad y buena tolerancia por parte de los pacientes, incluso a dosis elevadas, y su capacidad para atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica. Entre las patologías tratadas con este fármaco encontramos los trastornos causado por *jet-lag*, trastornos del sueño como el insomnio o últimamente síntomas depresivos y trastornos de ansiedad (Madsen y col., 2017; Weishaupt y col., 2006). En la bibliografía actual podemos encontrar numerosos estudios donde se muestra la capacidad antioxidante de la melatonina y su papel como antiapoptótico y antiexcitotóxico (Acuña-Castroviejo y col., 2009; Escames y col., 2004; Sainz y col., 2013). Existen varios estudios en modelos de ratones $SOD1^{G93A}$ que demuestran la capacidad de la melatonina para retrasar la progresión de la enfermedad hasta en un 25% (Ganie y col., 2016; Weishaupt y col., 2006; Zhang y col., 2013). Por otra parte, el estudio realizado por Jaiswal entra en contradicción con estos autores al mostrar que el riluzol sí es capaz de disminuir la degeneración de motoneuronas e inhibir moderadamente la excitotoxicidad al contrario que la melatonina (Jaiswal, 2016). Por el momento no se ha conseguido trasladar de una manera eficiente los estudios realizados en modelos animales a pacientes humanos debido a deficiencias en el diseño, la corta duración de los estudios y la gran variabilidad genética que presentan los humanos respecto a los modelos animales usados (Patel y Hamadeh, 2009). En la actualidad no existen muchos ensayos clínicos con melatonina, a parte de los realizados por los equipos de Jacob y Weishaupt en los años 2002 y 2006 respectivamente (Jacob y col., 2002; Weishaupt y col., 2006). En el estudio de 2006, Weishaupt y colaboradores utilizaron melatonina en una concentración de 300 mg/día aplicada a la hora de dormir en forma de supositorios. Esta nueva forma de aplicación presenta varias ventajas: rápida absorción vía enteral, evita el metabolismo de primer paso hepático y los pacientes no tienen que tragar (mecanismo que se ve comprometido en la ELA). Los 31 pacientes fueron tratados por Weishaupt y su grupo durante unos 12 meses demostrando que la aplicación crónica de melatonina no presenta ningún efecto adverso, incluso mejoró el ciclo del sueño de alguno de estos pacientes. Como resultado de este estudio, los autores han comprobado que tras el tratamiento de los pacientes de ELA con melatonina hay una mejora de los niveles de carbonilos proteicos, detectados en sangre periférica y utilizados como marcador bioquímico de estrés oxidativo, hasta alcanzar niveles similares a los de los pacientes control (Weishaupt y col., 2006). Este es un resultado prometedor que avalaría el uso de la melatonina como terapia farmacológica. No obstante, son necesarios más ensayos clínicos a parte de los disponibles hasta

la fecha, ya sea con melatonina sola o combinada con otros fármacos, para esclarecer el potencial del uso de este antioxidante en pacientes de ELA.

3. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

3. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

3.1. Planteamientos e hipótesis.

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades que están asociadas al envejecimiento y debido al aumento de la esperanza de vida de los individuos en los países desarrollados, el porcentaje de estas patologías ha aumentado en los últimos años de manera alarmante. Se caracterizan por una muerte progresiva y, en la mayoría de los casos, selectiva de las neuronas en distintas áreas del SNC. El gran impacto social y económico que estas enfermedades suponen tanto para los pacientes como para su entorno familiar, así como para los sistemas nacionales de salud de cada país hace imprescindible un mejor conocimiento de estas patologías, así como de los mecanismos patogénicos implicados y de nuevas terapias para el tratamiento de las mismas. La etiopatogenia de la mayoría de estas patologías, aún desconocida, parece ser multifactorial existiendo ciertos fenómenos comunes en todas ellas, como son el estrés oxidativo, la neuroinflamación, la agregación proteica y el daño mitocondrial. De entre todos estos procesos patogénicos, el estrés oxidativo, concretamente la producción de ROS, parece jugar un papel fundamental en la génesis de estas enfermedades. Una de las enfermedades neurodegenerativas más importantes, tanto por su gravedad, como por las limitaciones que supone padecerlas, es la ELA. En esta enfermedad, las neuronas afectadas son las neuronas de la corteza motora, las neuronas motoras del tronco del encéfalo y las neuronas de la médula espinal. Niveles elevados de estrés oxidativo se han encontrado en el LCR de pacientes que padecen ELA. No obstante, si el estrés oxidativo es el responsable directo de la degeneración neuronal en los pacientes con ELA y los mecanismos precisos por los que se produce la muerte neuronal o por los que el estrés oxidativo pudiera producir la muerte neuronal no se conocen con exactitud.

En este contexto, **la hipótesis de este trabajo** es que el estrés oxidativo *per se* es capaz de provocar alteraciones a nivel de las propiedades de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora y/o de sus entradas sinápticas y producir un desequilibrio en la excitabilidad que precedería a la muerte de las células.

3.2. Objetivos.

Con la finalidad de validar la hipótesis de trabajo nos planteamos como **objetivo general** estudiar el efecto del estrés oxidativo, generado por medio de un hidroperóxido orgánico, sobre las propiedades de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora y sobre la transmisión sináptica de esta población en preparaciones de rodaja in vitro.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Cuantificar el efecto del HC 10 μ M sobre las siguientes propiedades electrofisiológicas de membrana:
 - ✓ Potencial de membrana.
 - ✓ Resistencia de entrada.
 - ✓ Reobase, voltaje de despolarización y voltaje umbral.
 - ✓ Características del potencial de acción.
 - ✓ Ganancia de la relación entre intensidad de corriente inyectada y frecuencia de potenciales de acción generada.
 - ✓ Frecuencia máxima de disparo de potenciales de acción.
 - ✓ Corriente de cancelación del disparo repetitivo.
- Determinar y analizar si los efectos del estrés oxidativo sobre las propiedades de membrana son tiempo y/o dosis dependiente.
- Determinar la capacidad del HC para producir LPO en la población neuronal estudiada.
- Cuantificar el efecto del HC 10 μ M sobre la transmisión sináptica estudiando las siguientes características de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) e inhibitoras (IPSC):
 - ✓ Amplitud
 - ✓ Frecuencia
 - ✓ Pendiente de subida
 - ✓ Constante de bajada
- Comprobar si el antioxidante melatonina es capaz de ejercer como neuroprotector bajo las condiciones de este estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sujetos experimentales.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar jóvenes (20-40 días postnatales) de ambos sexos. Los experimentos se realizaron en estricta concordancia con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Directiva 2003/65 de la Comunidad Europea, así como al Real Decreto Español 120/2005 y a las regulaciones de la Universidad de Sevilla para el cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo de investigación seguido en los experimentos fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla (25-05-2013).

4.2. Preparaciones de rodajas cerebrales.

La técnica de preparaciones in vitro para el estudio de las áreas motoras del SNC se viene utilizando en nuestro grupo de investigación desde hace más de veinte años (ver por ejemplo los primeros estudios en Núñez-Abades y col., 1993, 2000). Para la obtención de las rodajas cerebrales, las ratas se anestesiaron profundamente con hidrato de cloral (4%, Panreac). Una vez desaparecidos los reflejos, tanto el de parpadeo como el de retracción de la extremidad, el animal se perfundió transcardíacamente con LCR artificial con bajo calcio a 4°C. Posteriormente, el animal se decapitó, el cerebro se extrajo rápidamente y se colocó en una placa de Petri fría que contenía LCR artificial modificado con un bajo contenido en calcio (Figura 4.1.A). En la placa, y con la ayuda de un bisturí, se seccionó el cerebro, se eliminó el cerebelo y nos quedamos únicamente con la parte más rostral que contiene la zona de estudio (Figura 4.1.B). El tejido se cortó en secciones transversas de un grosor de 300 μm usando un vibratomo (NVLSM1, WPI; Figura 4.1.C). Las rodajas cerebrales que contenían la corteza motora primaria (Figura 4.1.D) se colocaron durante 30 minutos en los pocillos de un recipiente o cámara de mantenimiento rellena de LCR artificial a $\sim 37^\circ\text{C}$. Posteriormente, las rodajas se mantuvieron durante un periodo < 6 horas a $\sim 21^\circ\text{C}$ en la misma cámara y solución (Figura 4.1.E). El LCR se burbujeó con una mezcla de gases que contenía 95% O_2 y 5% CO_2 . La composición del LCR artificial fue la siguiente (datos en mM): 126 NaCl, 2 KCl, 1,25 Na_2HPO_4 , 26 NaHCO_3 , 10 glucosa, 2 MgCl_2 y 2 CaCl_2 . Para la perfusión y el obtención de rodajas se modificó la solución de LCR artificial disminuyendo el calcio y aumentando el magnesio: 4 MgCl_2 mM y 0.1 CaCl_2 mM.

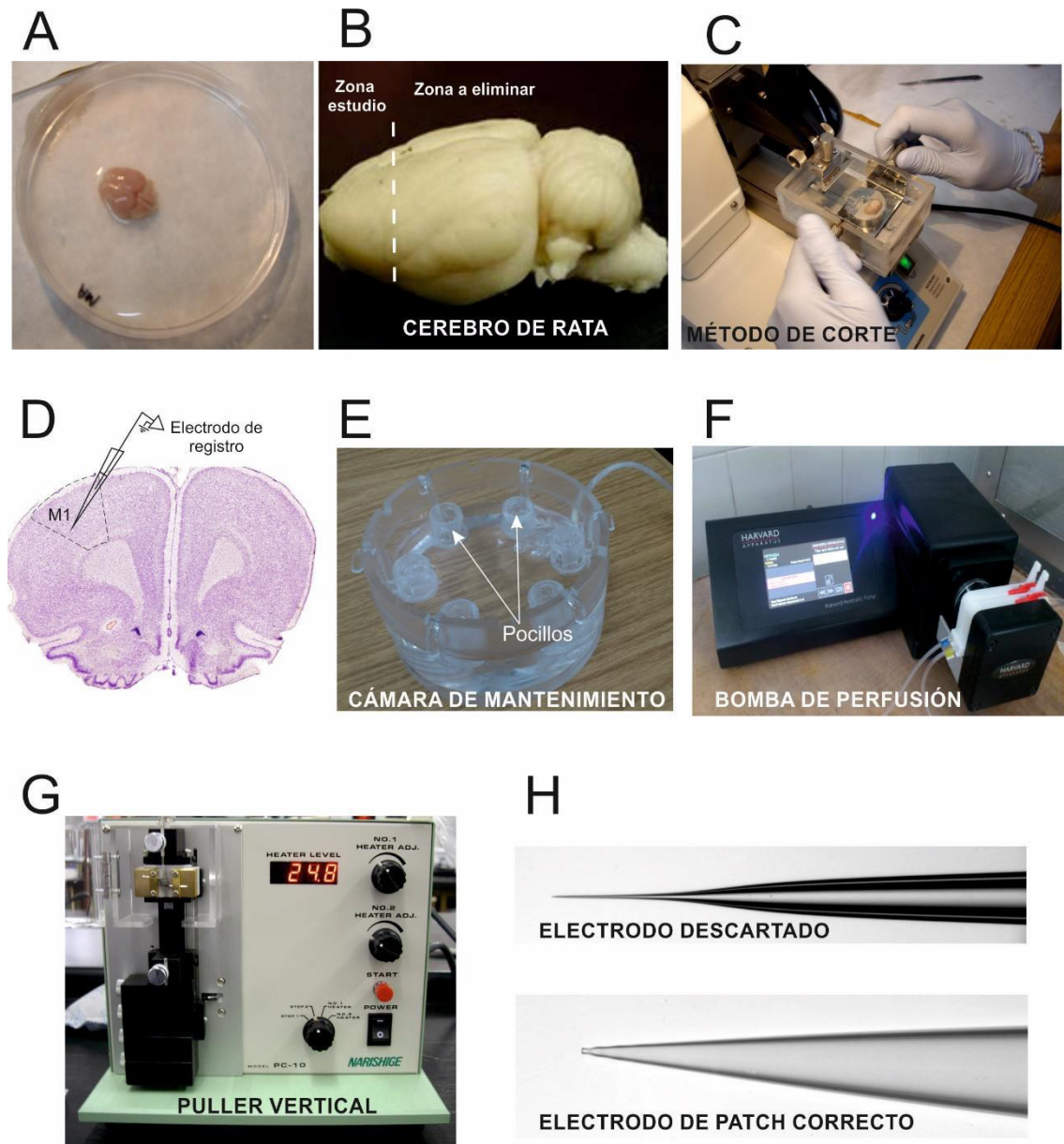


Figura 4.1. Obtención, preparación y mantenimiento de rodajas cerebrales, localización de la estructura y elaboración de microelectrodos. **A.** Cerebro recién extraído en placa de Petri con líquido cefalorraquídeo (LCR). **B.** Imagen mostrando la parte del cerebro de la rata que seleccionamos para el estudio. **C.** Fotografía ilustrando el método de corte del cerebro con el vibratomo. **D.** Imagen indicando la zona de estudio (M1: corteza motora primaria) en una rodaja representativa y la localización del electrodo de registro. **E.** Cámara de mantenimiento. **F.** Bomba de perfusión. **G.** Estirador de pipetas vertical. **H.** Electrodos. En la parte superior se muestra un electrodo que sería descartado en nuestro estudio por tener la punta demasiado fina, y en la parte inferior se muestra un electrodo de *patch* de características idóneas para realizar este proyecto.

4.3. Preparación de micropipetas/microelectrodos de *patch-clamp*.

Las micropipetas de *patch* se obtuvieron utilizando un estirador de pipetas vertical (PC-10, Narishige; Figura 4.1.G) a partir de tubos de vidrio de borosilicato de 1 mm de grosor con capilar interno (diámetro interno 0.6, diámetro externo 1 mm; Narishige GD-1). Para los experimentos de fijación de corriente, las micropipetas se rellenaron con una solución de gluconato de potasio (datos en mM): 120 K-gluconato, 10 KCl, 10 fosfocreatina, 2 MgATP, 0,3 NaGTP, 0,1 EGTA, 10 ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES). Esta solución se ajustó a pH 7,3 con KOH. Para los experimentos realizados en la configuración de fijación de voltaje las micropipetas se rellenaron con una solución en la que el gluconato de potasio se sustituyó por metanosulfonato de cesio y cuya composición fue (en mM): 125 MeSO₄Cs, 10 KCl, 10 HEPES, 0,5 EGTA, 2 ATP-Mg, 0,3 GTP-Na₂. En este caso la solución se ajustó a pH 7,3 con CsOH. Para los registros en fijación de voltaje en los que se pretendía demostrar la existencia de una corriente tónica dependiente de receptores GABA_A, se modificó la solución intracelular para llevar el ECl⁻ a 0 mV y así visualizar esta corriente con mayor facilidad. La composición fue la siguiente (en mM): 140 CsCl, 2 MgCl₂, 0,05 EGTA and 10 HEPES, ajustado a un pH de 7,3 con CsOH. La osmolaridad de todas las soluciones fue de 285-290 mosmol/kg, ajustada con sacarosa. Sólo se utilizaron aquellas micropipetas que cumplieron los siguientes requisitos: 1) punta firme; 2) bordes romos no cortantes; 3) disminución progresiva del diámetro desde el cono hasta la punta; y 4) que dieran lugar a microelectrodos de resistencia entre 5-7 MΩ para fijación de corriente y de entre 3-5 para fijación de voltaje. La figura 4.1.H ilustra en la parte inferior un electrodo de patch que cumple visualmente todas las características para un buen registro, y en la parte superior otro que sería directamente descartado por su aspecto.

4.4. Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en la configuración de célula entera.

Las rodajas que incluyeron la corteza motora primaria se transfirieron de una en una a la cámara de registro (Figura 4.2.A-B) dónde se perfundieron con LCR artificial oxigenado (pH 7,4; 33°C) con una bomba peristáltica (Harvard Apparatus) a una tasa de 1 mL/min (Figura 4.1.F). El LCR artificial se mantuvo durante todo el proceso de perfusión a 33°±1°C mediante un calentador con termostato (TC 324B; Warner). Las neuronas de la corteza motora se visualizaron usando un microscopio Nikon Eclipse FN1 equipado con una óptica de contraste interferencial diferencial para visualizar infrarrojo (IR-DIC), y una cámara WAT-902H2 Ultimate (Figura 4.2.A). Para el estudio se utilizaron dos objetivos: un objetivo de 4X de aire para localizar la zona de registro y un objetivo de inmersión en líquido de 40x para localizar las neuronas a registrar (Figura 4.2.B). Las neuronas corticales piramidales de la capa V se diferenciaron por su morfología típica que

incluye un gran soma con forma piramidal o triangular y una prominente dendrita apical que se extiende verticalmente hacia la superficie pial (Figuras 4.2.D).

Los registros se realizaron en la configuración de *whole-cell* o célula entera. En esta configuración el interior de la pipeta queda en contacto directo con el citoplasma, permitiendo estudiar la corriente o la diferencia de voltaje que existe a través de toda la membrana celular. El primer paso para la obtención de la citada configuración consiste en aproximar, con un micromanipulador monitorizado (Sutter MP-225; Figura 4.2.C), la punta de la pipeta a la superficie de la membrana (Figura 4.2.D). Es conveniente que a la pipeta se le aplique una ligera presión positiva para evitar que le entre solución extracelular y que se ensucie o bloquee, lo que imposibilitaría la formación posterior del sello. A continuación, la pipeta se va acercando al soma de la célula a registrar (Figura 4.2.E) y cuando aparece un halo blanco en la superficie del soma (Figura 4.2.F) se suprime la presión positiva y se aspira levemente hasta que exista una adhesión perfecta entre el exterior de la pipeta y la membrana de la célula. Se dice entonces que se ha formado un sello de alta resistencia o giga-sello (denominado así porque la resistencia obtenida y monitorizada en el ordenador es de entre 1 y 100 gigaOhms, Figura 4.2.G-H). En este momento nos encontramos en la configuración de *cell-attached* o célula adherida, siendo necesario aplicar una ligera succión adicional para conseguir que el sello se rompa y que el interior de la pipeta entre en contacto con el citoplasma. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo utilizando el amplificador MultiClamp 700B (Multiclamp 700B, Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (Figura 4.2.G). Solo los registros obtenidos con pipetas con una resistencia de acceso entre 5 y 20 M Ω se aceptaron para su posterior análisis. Las corrientes capacitivas rápidas debidas al circuito RC constituido por la membrana celular se compensaron mediante el software del Multiclamp 700B en un 50-70%, al igual que los producidos por la micropipeta que se compensaron de forma automática tras la formación del Gigasello. Los registros se pasaron por un filtro de baja frecuencia a 2-10 kHz y los datos obtenidos se digitalizaron a 20 kHz con un convertidor análogo – digital Digidata 1550 (Figura 4.2.G) y se adquirieron usando el programa pCLAMP 10 (Molecular Devices). Los datos se almacenaron en un ordenador (TTL computer con Intel inside Core i3; Figura 4.2.H) y posteriormente se analizaron utilizando el software Clampfit 10.4 (Molecular Devices) y en el caso de los experimentos de eventos sinápticos el software Stimfit 0.14 (<https://github.com/neurodroid/stimfit>).

4.4.1. Registros de fijación de corriente y análisis.

En la primera parte de nuestra investigación realizamos experimentos de fijación de corriente con el objeto de estudiar el efecto del HC en las propiedades intrínsecas de membrana

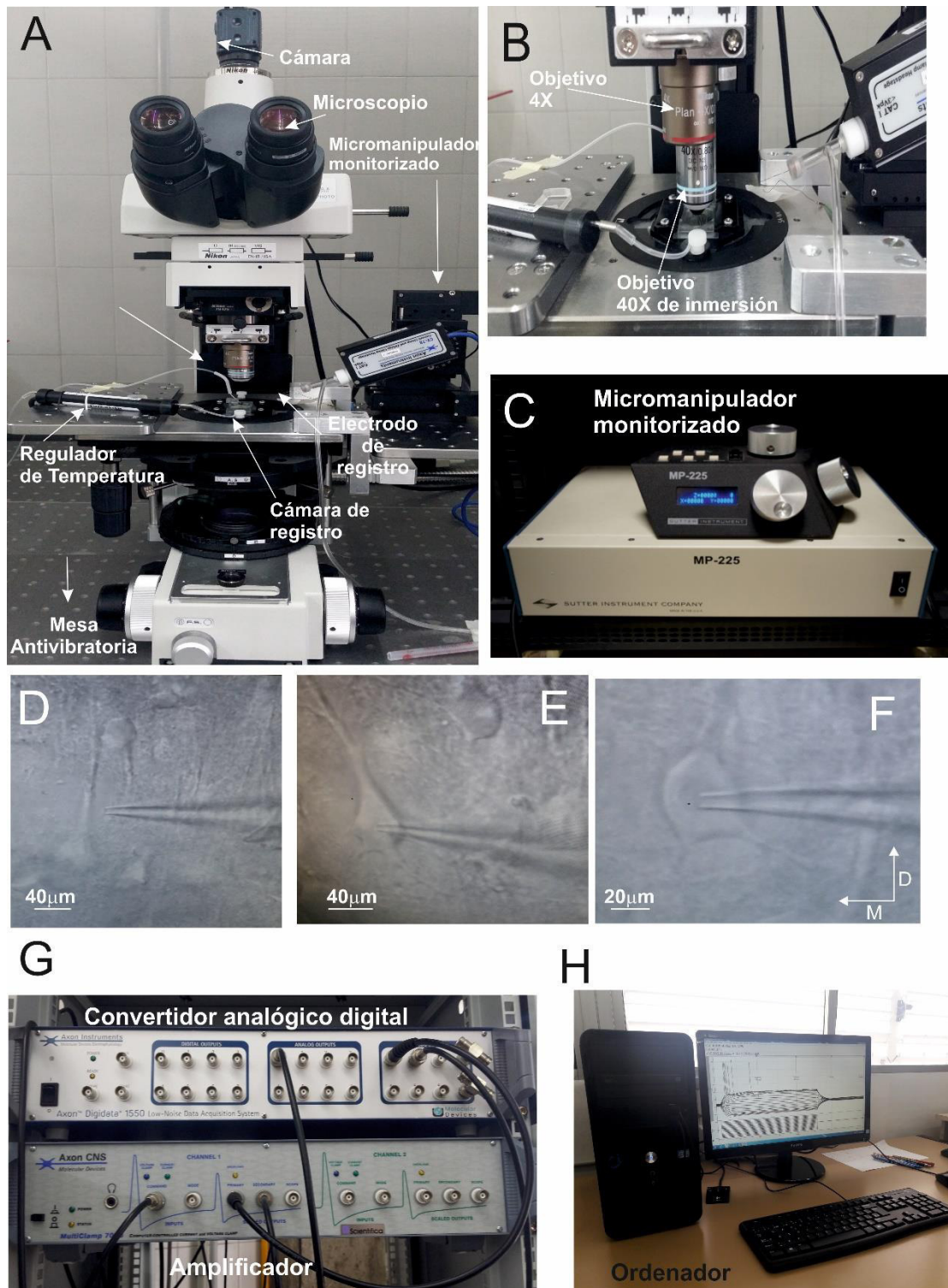
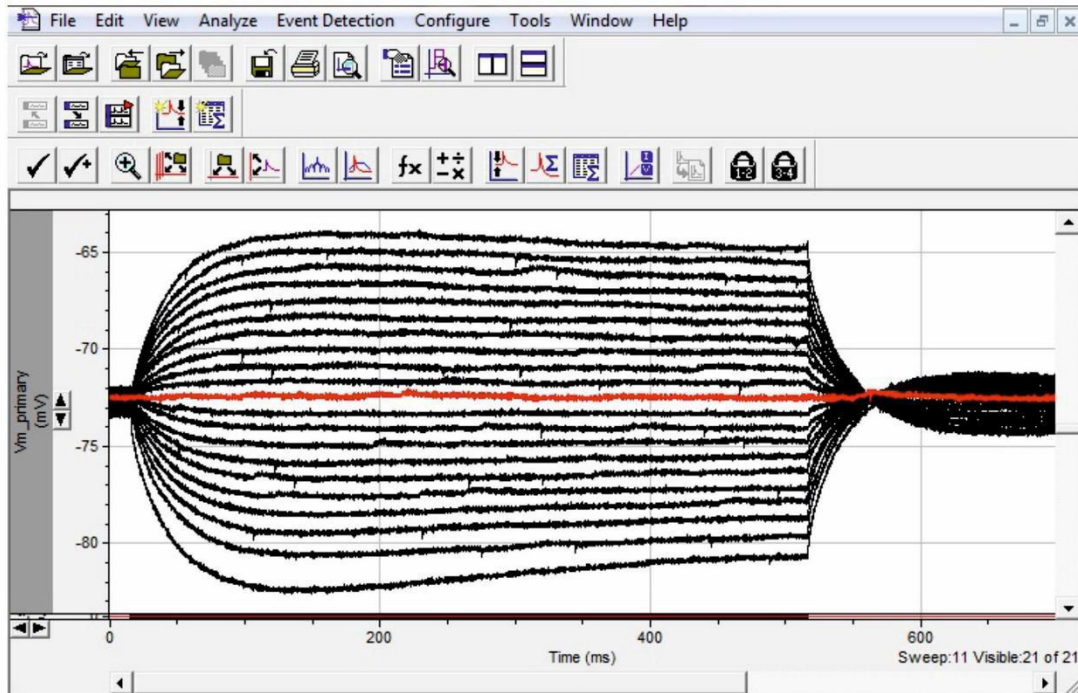


Figura 4.2. Sistemas de visualización, registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica. **A.** Fotografía ilustrando los equipos necesarios para la visualización de las células y los accesorios de registro para *patch-clamp*. **B.** Objetivos utilizados para el estudio y cámara de registro. **C.** Micromanipulador monitorizado. **D-F.** Imágenes mostrando la aproximación del electrodo a la superficie del soma de las neuronas seleccionadas. En la foto D = dorsal, y M = medial. **G-H.** Fotografías ilustrando los equipos utilizados para el registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica.

de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria. Para ello, se analizaron sus parámetros electrofisiológicos en situación de control, y posteriormente se añadió a la perfusión de LCR artificial, HC a una concentración de 10 μ M. Los parámetros se cuantificaron a los 5, 15 y 30 minutos de la aplicación del oxidante. Los parámetros que se registraron y cuantificaron fueron los siguientes: capacitancia celular, potencial de membrana de reposo, resistencia de membrana (resistencia de entrada), reobase, voltajes de despolarización y umbral, amplitud y duración del potencial de acción, ganancia de la frecuencia de disparo, frecuencia máxima de disparo y corriente de cancelación.

El potencial de membrana en reposo se midió como la diferencia entre los potenciales intracelulares y extracelulares tras la extracción del electrodo de registro de la célula. La resistencia de entrada, a la que a lo largo del texto nos vamos a referir como resistencia de membrana o simplemente resistencia, se determinó mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente positivos y negativos (500 ms, 1 Hz; con incrementos de 5 pA; Figura 4.3.A) y se calculó como la pendiente de la relación existente entre corriente y voltaje (relación I - V). Cuando hubo evidencias de una rectificación de voltaje, o sag, el valor de voltaje usado para el cálculo de la resistencia fue el valor alcanzado en el pico de voltaje. La reobase, que se define como la mínima corriente inyectada (pulso cuadrado de 100 ms, 1 Hz; incrementos de 5 pA) que genera un potencial de acción en el 50% de los casos, se determinó aplicando pulsos de corriente despolarizantes (100 ms, 1Hz, en pasos de 10 pA). El voltaje de despolarización fue el incremento de potencial de membrana requerido por la célula para alcanzar el umbral de disparo. El voltaje umbral se tomó como aquel valor del potencial de membrana al que se producía el potencial de acción con la corriente reobase. El potencial de acción unitario se produjo mediante pulsos despolarizantes (100 μ s, 5–20 nA). En el potencial de acción se determinó la amplitud y duración. La amplitud se calculó como la diferencia en voltaje entre el umbral del potencial y el pico. El valor de la duración del potencial de acción fue determinado como la anchura a la mitad de su amplitud. La frecuencia de disparo se midió con pulsos cuadrados de corriente despolarizantes (1 s, 0.5 Hz; incrementos de 10–50 pA; Figura 4.3.B). La frecuencia tónica de disparo repetitivo de potenciales de acción se tomó como la media del número de espigas durante los últimos 500 ms de la descarga repetitiva. La ganancia se calculó como la pendiente de la relación existente entre la frecuencia de disparo y la corriente aplicada (relación I - F). La frecuencia máxima de disparo se consideró como la frecuencia más alta alcanzada por la neurona y la corriente de forma repetitiva.

A



B

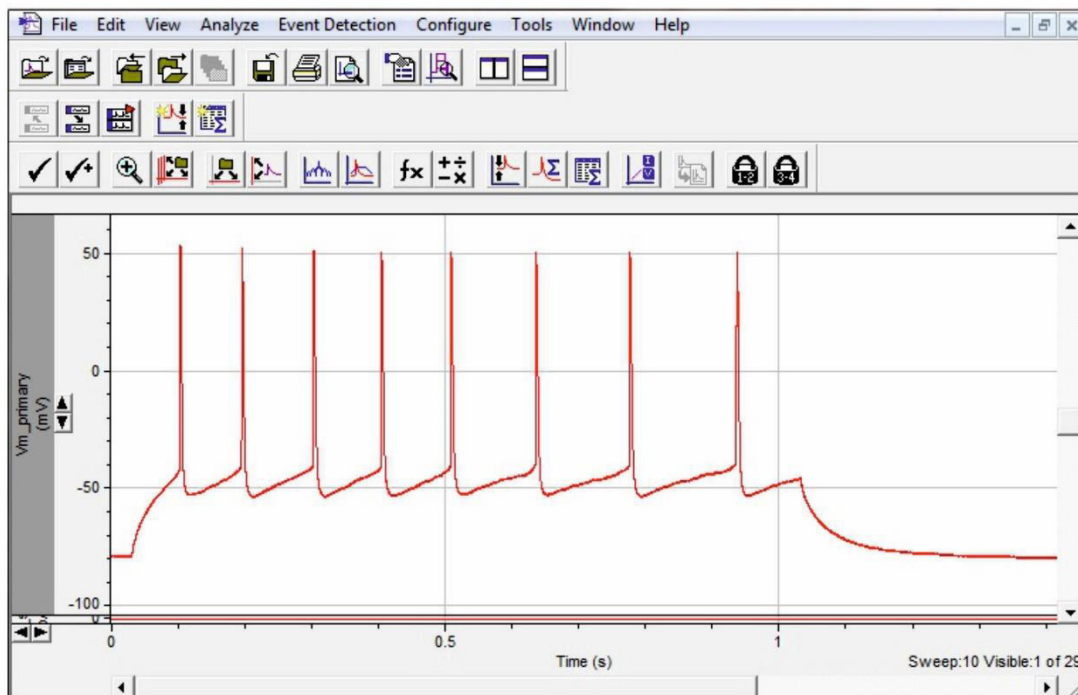


Figura 4.3. Análisis de los parámetros electrofisiológicos de una neurona piramidal de la corteza motora usando el software Clampfit 10.4. **A.** En esta figura podemos observar el análisis de la resistencia de entrada de una neurona piramidal de la corteza motora. En ella se observa la respuesta en voltaje a pulsos cuadrados de corriente positiva y negativa de 500 ms de duración. En rojo aparece representado el cero o línea base del potencial de membrana de la neurona. **B.** En esta figura vemos el análisis de las propiedades repetitivas de disparo de una neurona piramidal. En ella podemos observar el patrón de disparo de la neurona en respuesta a un pulso de corriente despolarizante de 1 segundo de duración. Nótese también la amplitud de los potenciales de acción que genera la neurona, cercanos a los 100 mV.

Posteriormente, quisimos saber si los efectos encontrados en la primera parte de nuestro estudio tras la aplicación de HC a 10 μM eran reversibles. Como el efecto de muchos compuestos depende del tiempo de actuación del mismo, el estudio de la reversibilidad del HC se realizó a dos tiempos diferentes de actuación. En primer lugar se estudió la reversibilidad del HC a los 5 minutos de tratamiento y en segundo lugar se estudió la reversibilidad del HC a los 15 minutos del tratamiento. En ambos casos el protocolo fue el siguiente: 1) se perfundió la rodaja con LCR artificial y se registró en situación control los parámetros fisiológicos de la neuronal piramidal seleccionada; 2) se perfundió la rodaja con LCR artificial conteniendo 10 μM de HC durante 5 o 15 minutos y se registró los parámetros fisiológicos en esta situación de LPO; y 3) se perfundió la rodaja con LCR artificial y se volvieron a registrar los parámetros fisiológicos a los 15 y 30 minutos del lavado del oxidante. Este protocolo se llevó a cabo de forma secuencial en la misma neurona y finalmente se compararon los parámetros en situación control, durante la perfusión con HC y durante el lavado del oxidante.

Una vez caracterizados los efectos del HC a 10 μM quisimos estudiar si estos efectos eran los mismos independientemente de la concentración del oxidante, o si por el contrario, el HC ejercía efectos diferenciales sobre las propiedades electrofisiológicas de las neuronas dependiendo de su concentración. Para ello se escogieron otras dos concentraciones de 1 y 100 μM , y a continuación se realizó a estas dos nuevas concentraciones el mismo experimento que para 10 μM . Así, la rodaja se perfundió inicialmente con LCR artificial normal, para estudiar sus parámetros electrofisiológicos en la configuración de fijación de corriente en situación control, y posteriormente con LCR artificial que contenía 1 o 100 μM de HC durante 30 minutos. Las respuestas en voltaje se adquirieron a los 0, 5, 15 y 30 minutos tras la aplicación del HC. Finalmente se hicieron 2 tipos de comparaciones: 1) para cada concentración de HC se estudió el efecto de este oxidante con el tiempo, comparando los valores de los parámetros a los 0, 5, 15 y 30 minutos en la misma célula; y 2) se comparó el efecto producido por la perfusión de HC entre las 3 poblaciones de neuronas de corteza motora expuestas a las distintas concentraciones de HC (1, 10 y 100 μM). En este caso sólo se compararon los valores a los 30 minutos de registro. Al tratarse de poblaciones diferentes y no partir del mismo origen exacto, no se comparó el valor absoluto de los parámetros sino el valor del incremento en cada parámetro producido por el HC.

Para asegurarnos que existían diferencias dependientes de concentración de HC en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la corteza motora se realizó un experimento adicional. En este caso, se expuso una misma neurona a las 3 concentraciones de HC de forma secuencial en orden creciente de concentración durante 10 minutos por concentración. Los

parámetros electrofisiológicos fueron analizados antes de la administración del HC y diez minutos después de la exposición a cada una de las 3 concentraciones y se compararon entre sí.

En los experimentos de fijación de corriente, todas las neuronas piramidales incluidas en los análisis mostraron un potencial de membrana de reposo estable de al menos -60 mV, un potencial de acción mayor de 90 mV y un disparo repetitivo en respuesta a pulsos despolarizantes (supra umbrales) de 1 segundo de duración. El electrodo se balanceó de forma periódica durante el registro para eliminar la posible modificación en la resistencia del electrodo. Los registros que mostraron deterioro en alguna propiedad electrofisiológica durante los estudios control fueron descartados. Para evitar problemas asociados con un lavado incompleto del HC o una recuperación incompleta de las condiciones control solo se registró una neurona piramidal por rodaja.

4.4.2. Registros en fijación de voltaje y análisis:

En el siguiente paso de nuestra investigación abordamos el estudio del efecto del HC sobre las EPSC e IPSC en configuración de fijación de voltaje. Para ello se registraron los EPSC e IPSC, tanto los espontáneos como los miniatura (aquellos registrados en presencia de tetrodotoxina (TTX), que bloquea la liberación sináptica potencial de acción dependiente), fijando el potencial de membrana en -70mV (para registrar los EPSC) ó 0mV (para registrar los IPSC).

Para detectar las corrientes postsinápticas o eventos sinápticos se utilizaron registros continuos de 60 segundos de duración en cada una de las situaciones estudiadas: control (minuto 0) y a los 5, 15 y 30 minutos de aplicación de HC. Las corrientes postsinápticas espontáneas y en miniatura se analizaron con el software Stimfit 0.14 (Figura 4.4.) como se describe a continuación: Primero, se creó un molde preliminar ajustando una función (algoritmo descrito por Jonas y col., 1993) a un solo evento sináptico, elegido como representativo por ser unitario y de gran amplitud. A continuación, se estableció un umbral de detección muy restrictivo (80% de similitud al molde) y el software detectó en la totalidad del registro todos las corrientes sinápticas que se asemejaron a dicho molde. Seguidamente, se generó un nuevo molde o molde final ajustando de nuevo una función al promedio resultante de las corrientes sinápticas detectadas. Finalmente el software busca todos los eventos posibles que se ajustan al molde final, pero ahora se usó un umbral de detección menos restrictivo que el primero (60%). Al bajar el umbral de detección el software puede añadir falsos positivos o artefactos, que deben eliminarse manualmente. Por último, se realizó un ajuste a una función biexponencial al promedio de los eventos que se seleccionaron. Los parámetros que analizamos fueron los siguientes: 1) frecuencia (Hz) o número de corrientes

sinápticas por segundo; 2) amplitud media (pA) de las corrientes sinápticas detectadas; 3) pendiente de subida del evento (medido al 10-90%), que se define como el tiempo requerido por la señal para cambiar del 10% al 90% del valor de la amplitud desde la línea base al pico de amplitud; 4) constante de bajada (ms), definido como la constante de tiempo de la fase de vuelta a la línea base de partida de la señal; y 5) t50 o tiempo medido a la mitad de la amplitud del evento sináptico.

Por último, quisimos demostrar la presencia de una corriente tónica inhibitoria en las neuronas piramidales de la corteza motora primaria e investigar si esta corriente tónica se veía afectada por HC. Durante estos experimentos, el potencial de membrana de las motoneuronas se continuó fijando en -70 mV, y se usó una solución intracelular basada en CsCl para obtener $E_{Cl^-} \sim 0$ mV. La amplitud de la corriente tónica mediada por los receptores $GABA_A$ se calculó como la diferencia entre el nivel de corriente control y el nivel de corriente tras la inyección de un antagonista de los receptores $GABA_A$.

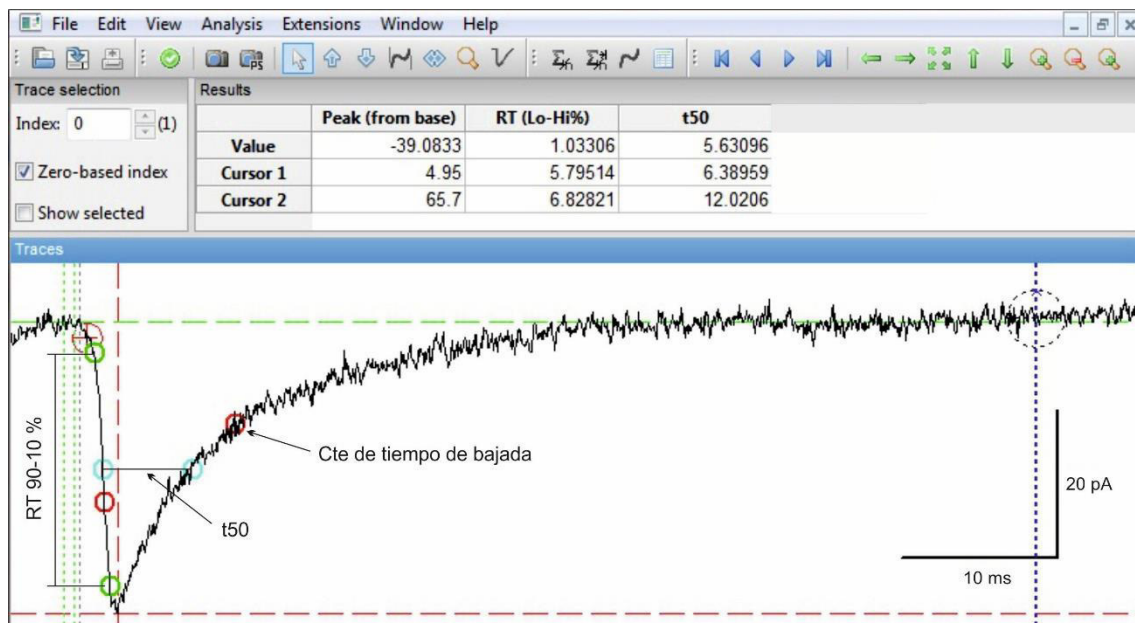


Figura 4.4. Análisis de los eventos sinápticos utilizando el Software Stimfit 0.14. Figura que muestra parte del proceso de análisis de un evento sináptico utilizando el software Stimfit 0.14. Las líneas punteadas perpendiculares que se observan en la figura (en colores verde y gris) son cursores utilizados para determinar de forma automática la línea base (línea discontinua horizontal verde) y el pico máximo de amplitud del evento (línea discontinua horizontal roja). Sobre el evento podemos observar varios círculos de distintos colores que son los que nos marcan los parámetros analizados. Los círculos verdes a la izquierda del evento nos marcan la pendiente de subida que se define como el tiempo que transcurre desde que la señal pasa de un 10 a un 90 % de su valor total de amplitud. Los círculos azules indican el t50, el tiempo medido a la mitad de la amplitud total desde la línea base del evento analizado. El círculo rojo nos marca la constante de tiempo de bajada.

4.5. Soluciones farmacológicas.

La solución de HC se preparó justo antes de los experimentos a partir de una solución pura de HC (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) almacenada a -80°C . Los pasos a seguir hasta conseguir la dilución deseada de $10\text{ }\mu\text{M}$ fueron los siguientes: 1) se tomó $5,5\text{ }\mu\text{L}$ de HC puro y se mezcló con $494,5\text{ }\mu\text{L}$ de LCR; 2) dado que el HC es muy hidrófobo, la mezcla se homogenizó con la ayuda de un baño ultrasónico. Se supo que estaba bien disuelto porque la solución adquiere un color blanquecino; y 3) una vez realizado el paso anterior se obtiene una solución stock de 60 mM . De esa solución tomamos $17\text{ }\mu\text{L}$ y lo añadimos a 100 ml de LCR normal obteniendo una concentración final de $10\text{ }\mu\text{M}$.

En los experimentos en los que se estudió el efecto del HC sobre los eventos sinápticos se utilizaron los siguientes fármacos: Tetrodotoxina (TTX, $1\text{ }\mu\text{M}$; Tocris Bioscience, Bristol, UK), 2-(3-carboxipropil)-3-amino-6-metoxifenil-piridazinium bromuro (SR95531 o Gabazina, $20\text{ }\mu\text{M}$; Tocris Bioscience, Bristol, UK), d-amino-fosfonovalerato (APV, $20\text{ }\mu\text{M}$; Tocris Bioscience, Bristol, UK) y 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona (CNQX, $50\text{ }\mu\text{M}$; Tocris Bioscience, Bristol, UK). Todos los fármacos se prepararon con antelación a la realización de los experimentos en soluciones stock ($1\text{-}10\text{ mM}$) y se almacenaron a -20°C .

Posteriormente se realizaron experimentos para analizar la capacidad antioxidante de la melatonina. Para ello se preparó una solución de melatonina a una concentración de $50\text{ }\mu\text{M}$ (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) en LCR artificial, en las que se incubaron las rodajas de cerebro por un periodo mínimo de dos horas. La perfusión de las rodajas en la cámara de registro se hizo con la misma solución, a una tasa de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a la cual se añadió posteriormente el HC $10\text{ }\mu\text{M}$. Las disoluciones que contenían melatonina se protegieron de la luz para evitar su degradación.

El tiempo de intercambio en la cámara de registro entre el LCR artificial y las soluciones utilizadas, con cualquiera de los fármacos antes mencionados, fue de $1\text{ minuto y }30\text{ segundos}$, aproximadamente.

4.6. Métodos bioquímicos para la determinación de la peroxidación lipídica.

Para completar nuestra investigación quisimos determinar el nivel de estrés oxidativo inducido por el HC. Para ello usamos una técnica para la medición de hidroperóxidos, basada en la rápida oxidación del Fe^{2+} mediada por hidroperóxidos bajo condiciones ácidas. El Fe^{3+} forma un cromóforo con naranja de xilenol que presenta una fuerte absorción a 560 nm (Jiang y col., 1991).

Las rodajas de cerebro que contenían la corteza motora primaria se sumergieron en LCR artificial con 1, 10 y 100 μM de HC y se incubaron durante 5, 15 y 30 minutos. Las rodajas se colocaron posteriormente en LCR normal para parar la reacción en cadena provocada por el HC y se almacenaron a continuación en una solución HEPES. Las rodajas se homogeneizaron durante 10 segundos utilizando un sonicador (Hielscher UP 100H). A continuación las muestras se centrifugaron a 2400 x g y se recogió el sobrenadante. El total de proteínas se determinó utilizando el método de Lowry. El protocolo para la medición de la LPO se adaptó para un lector de microplacas (Asys UVM 340). Se incubaron 40 μg de proteínas con 90 μl de H_2SO_4 durante 30 minutos. Después de la adición de 100 μl de la solución FOX (0.5 mM sulfato ferroso de amonio, 0.2 mM naranja de xilenol y 200 mM sorbitol en 25 mM H_2SO_4) la mezcla se incubó protegida de la luz a temperatura ambiente durante 45 minutos. La formación de iones férrico se detectó mediante la medida del complejo coloreado resultante con naranja de xilenol.

El mismo método se utilizó para estudiar el efecto protector de la melatonina frente a la LPO. En este caso el protocolo fue el siguiente: 1) se incubaron las rodajas en LCR artificial con melatonina 50 μM durante al menos dos horas y se analizaron los niveles de LPO para compararlos con el control y descartar efectos en la peroxidación simplemente debidos a la melatonina; 2) se incubaron rodajas en LCR artificial 10 μM de HC durante 5, 15 y 30 minutos y se estudió los niveles de LPO; y 3) rodajas incubadas con melatonina durante 2 horas se expusieron a continuación a LCR artificial con 10 μM de HC durante 5, 15 y 30 minutos y se estudiaron los niveles de LPO.

4.7. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico hemos usado los software SPSS 22.0 (IBM software, Armonk, NY, USA) y GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). La distribución de los datos se analizó con un test de normalidad (Shapiro–Wilk Test). Se usó un t-test pareado para comprobar que los valores medios (minuto 0 y minuto 30) no variaban en los experimentos realizados para comprobar la viabilidad celular en un registro de larga duración usando la configuración de célula entera. Un análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para comparar las medias de los parámetros electrofisiológicos en los experimentos realizados para comprobar el efecto del lavado del oxidante, y para analizar las diferencias en la aplicación secuencial del HC a distintas concentraciones. El test ANOVA de medidas repetidas se usó para analizar las medias de las variables tiempo (0, 5, 15 y 30 minutos) y concentración (1 μM , 10 μM , and 100 μM) para cada uno de los parámetros electrofisiológicos. Cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó el test de Bonferroni para realizar comparaciones pareadas entre grupos.

En los experimentos realizados para estudiar el efecto del HC sobre los eventos sinápticos se usaron los mismos test estadísticos antes mencionados. Para saber si existen diferencias estadísticas en los distintos parámetros, entre las condiciones control y el resto de situaciones experimentales en la misma célula, se utilizó un test ANOVA de medidas repetidas para comparar las medias de los diferentes grupos de tratamiento. Cuando se encontraron diferencias significativas se usó el test de Bonferroni para realizar comparaciones pareadas entre grupos. Para analizar si había alguna diferencia significativa entre las corrientes postsinápticas de diferentes grupos de células, uno tratado con TTX y el otro tratado durante 30 minutos con HC, usamos el test de la t de Student.

En todos los casos dos grupos se consideraron significativamente diferentes si $P \leq 0.05$ (intervalo de confianza del 95%). La correlación entre variables se midió utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r). Los resultados recogidos en las tablas se han expresado como la media \pm el error estándar de la media; donde n es el número de células analizadas. En las figuras y tablas representadas a lo largo de esta tesis un asterisco indica una diferencia estadística entre el control (las condiciones iniciales; minuto 0) y otro grupo (minuto 5, 15 o 30), mientras que una cruz indica una diferencia estadística entre dos grupos consecutivos.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efectos del hidróperóxido de cumeno sobre el potencial de membrana de reposo en neuronas piramidales de la corteza motora.

Las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora se identificaron morfológicamente por su soma piramidal y su dendrita apical orientada dorsalmente. Estas neuronas presentaron en condiciones control un potencial de membrana de reposo estable de $-70,7 \pm 1,3$ mV (Tabla 5.1) en el que no se observaron potenciales de acción espontáneos. La figura 5.1.A ilustra, en una neurona representativa, el efecto de la perfusión de la rodaja con $10 \mu\text{M}$ de HC sobre el potencial de membrana. En ella se observa que el potencial de membrana se despolariza aproximadamente 6 mV tras 15 minutos de perfusión. Como se muestra en la figura 5.1.B y en la tabla 5.1 para el total de la población estudiada ($n=30$), el potencial de membrana se despolarizó significativamente a los 5 minutos de la administración del oxidante. Posteriormente el potencial de membrana alcanzó valores algo más despolarizados a los 15 y 30 minutos, aunque las diferencias respecto a los 5 minutos no fueron estadísticamente significativas (Figura 5.1.B; Tabla 5.1). Así, el cambio medio en el potencial de membrana respecto al control fue $3,7 \pm 1,3$ mV a los 5 minutos, $5,6 \pm 1,7$ mV a los 15 minutos y $6,5 \pm 1,4$ mV a los 30 minutos (Figura 5.1.C). No obstante, en uno de los casos estudiados la célula sufrió una gran despolarización (>25 mV) a los 30 minutos de exposición al HC y perdió por completo la capacidad de producir potenciales de acción.

5.2. Efectos del hidróperóxido de cumeno sobre la resistencia de membrana en neuronas piramidales de la corteza motora.

Además de medir el efecto del HC sobre el cambio en el potencial de membrana, se monitorizó al mismo tiempo el cambio que se produjo en la resistencia de dicha membrana. Para ello se aplicaron pulsos de corriente negativa (-100 pA; 200 ms) cada minuto y se midió la respuesta en voltaje. En la figura 5.1.A se observa un aumento progresivo en la amplitud de la respuesta en voltaje frente a estos pulsos en los primeros 5 minutos tras la aplicación del HC (obsérvese el cambio desde la primera flecha hasta la segunda). Aplicando la ley de Ohm ($R=V/I$), el cambio en voltaje indicó un aumento en la resistencia de la membrana. Concretamente la resistencia de la célula pasó de un valor en situación control de $238 \text{ M}\Omega$, a $290 \text{ M}\Omega$ a los 5 minutos. A continuación, el cambio en el potencial de membrana a los mismos pulsos de corriente fue disminuyendo progresivamente (obsérvese el cambio desde la segunda flecha hasta la tercera) hasta alcanzar un valor de resistencia de $171 \text{ M}\Omega$ a los 15 minutos.

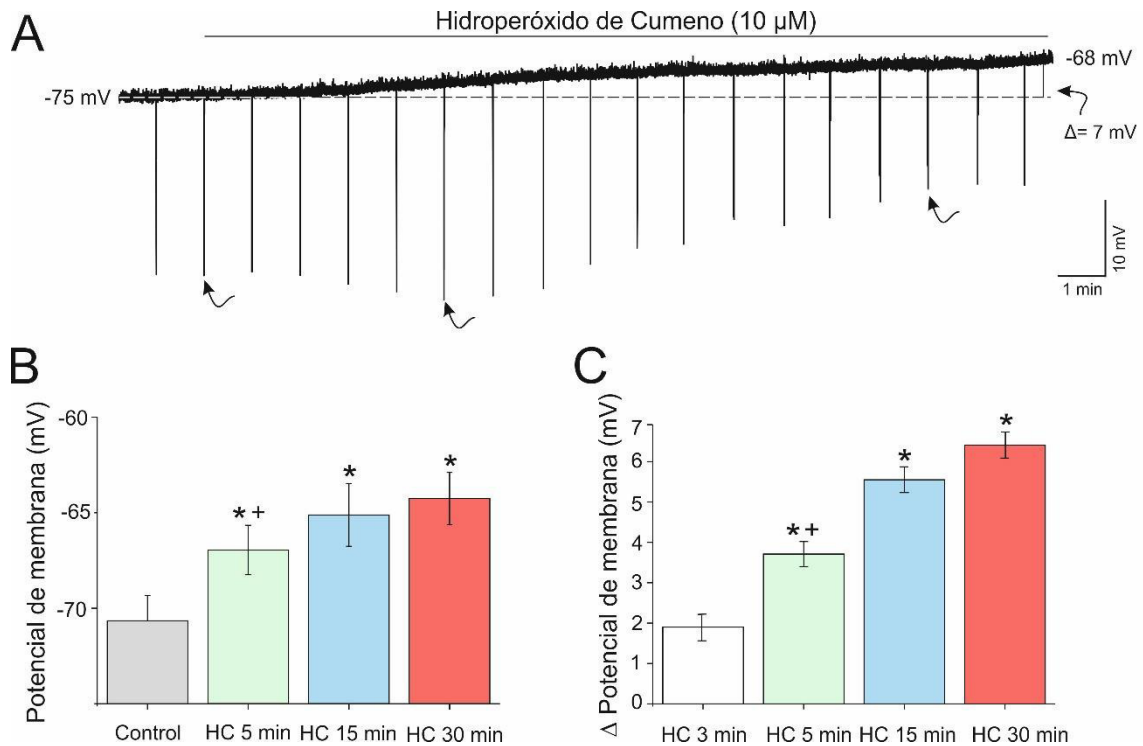


Figura 5.1. Efectos del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre el potencial de membrana en neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Registro en el que se muestra la respuesta típica del potencial de membrana y la respuesta en voltaje a pulsos de corriente negativa de -100 pA al añadir HC 10 µM al baño de perfusión. La primera flecha negra, situada a la izquierda, indica el cambio en voltaje en situación control, la segunda a los 5 minutos tras la aplicación de HC y la tercera a los 15 minutos tras la aplicación de HC. **B.** Histograma ilustrando el valor de potencial de membrana en situación control y a 5, 15 y 30 minutos de administración de HC. **C.** Histograma donde se muestran los incrementos del potencial de membrana acumulado, a partir de la situación control, a los 3, 5, 15 y 30 minutos. En esta figura y en las siguientes: i) las medidas están expresadas en media \pm su error estándar, ii) los asteriscos indican significación estadística entre dicha columna y la situación control y iii) las cruces representan significación estadística entre columnas correlativas.

Un análisis más detallado del efecto del HC sobre la resistencia de la membrana se realizó mediante la inyección de pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes (desde -50 pA hasta +50 pA con incrementos de 5 pA) de 500 ms de duración. En la figura 5.2.A-D se muestran en una neurona representativa las respuestas en voltaje de la membrana a la inyección de corriente en las distintas situaciones de estudio (control, 5, 15 y 30 minutos tras la administración del HC). Como se puede observar en la figura, a los 5 minutos tras la exposición al HC la célula presenta una mayor respuesta en voltaje frente a los mismos pulsos de corriente respecto de la situación control. Sin embargo, a los 15 y 30 minutos esta respuesta fue menor respecto a dicha situación control. Además, también se puede observar que tanto en la situación control como a los 5 minutos tras la aplicación del HC la neurona muestra una rectificación del potencial de

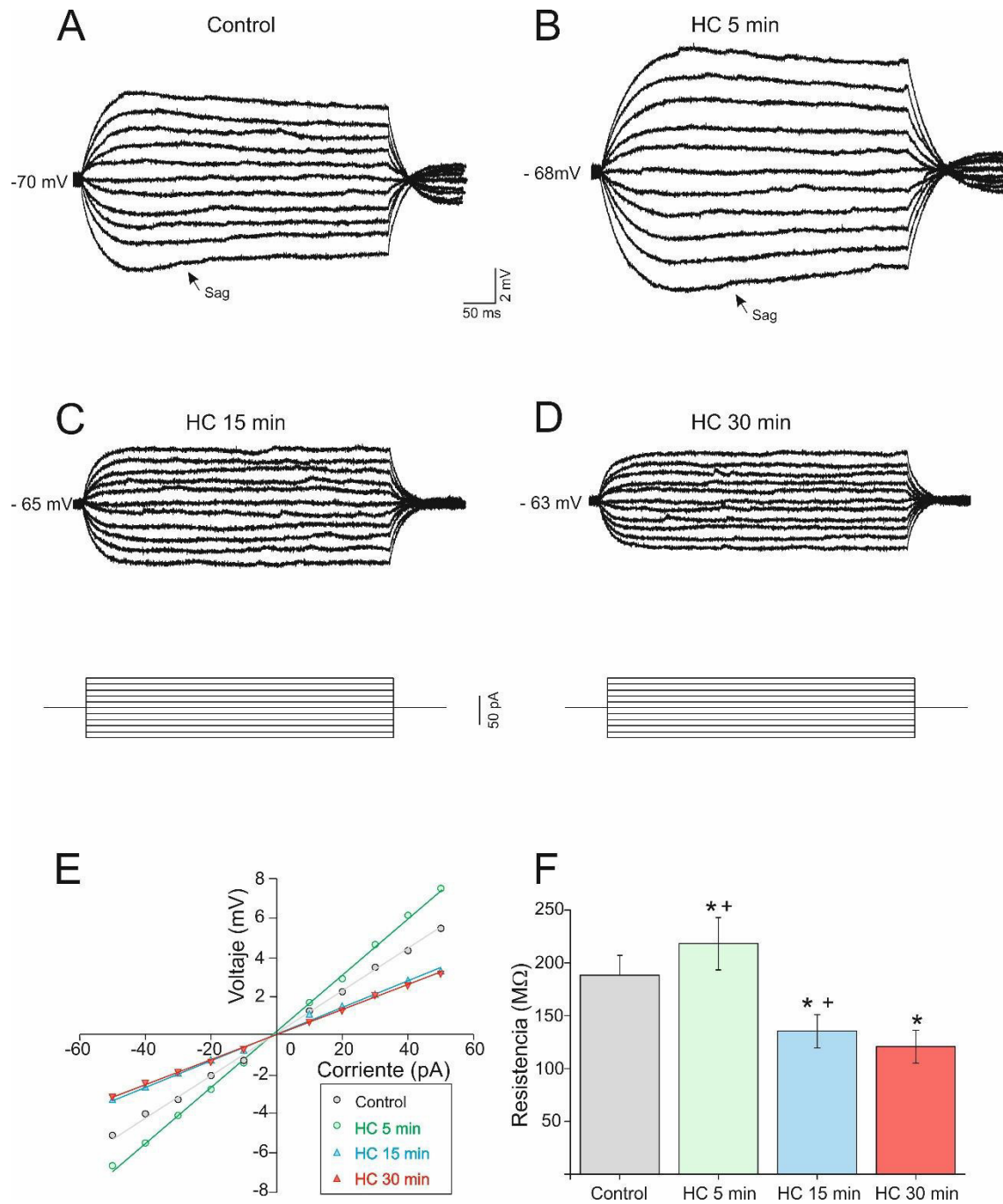


Figura 5.2. Efectos del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre la resistencia de membrana en neuronas piramidales de la corteza motora. A-D. Respuestas del voltaje de membrana a pulsos de corriente despolarizante e hiperpolarizante de 500 ms de duración. Se representan para simplificar la figura los pulsos con incrementos de 10 pA. En las figuras A y B es posible observar también la presencia de sag (flecha). **E.** Relación entre la corriente y la respuesta en voltaje de la membrana en la misma célula representada en A-D. **F.** Histograma donde se muestran los valores medios de resistencia de membrana para el total de la población.

membrana, conocida como sag, aproximadamente a los 80 ms de duración del pulso hiperpolarizante (que responde a la activación de una corriente I_h , Robinson y Siegelbaum, 2003). Este sag desaparece a los 15 minutos de aplicación de HC. La figura 5.2.E muestra la relación entre la intensidad y la respuesta en voltaje de la neurona representada en 5.2.A-D. Los valores de voltaje representados en esta figura se midieron en el pico de máximo cambio en voltaje (aproximadamente a los 80 ms). A partir de los datos se obtuvo una relación lineal entre la intensidad de la corriente y la respuesta en voltaje de la membrana (Figura 5.2.E). Este ajuste lineal ($P < 0,001$; $r > 0,98$) fue similar en toda la población de neuronas estudiadas. De la pendiente de la recta obtenida en la representación de la relación I/V se obtuvo el valor de resistencia de la membrana. Para el caso de la neurona representada en la figura 5.2.A-E la resistencia control de la neurona fue de 108 M Ω (Figura 5.2A y E), que aumentó a los 5 minutos hasta un valor de 134 M Ω (Figura 5.2B y E) para luego ir descendiendo a los 15 y 30 minutos a valores de 67 M Ω (Figura 5.2C y D) y 64 M Ω (Figura 5.2D y E), respectivamente. Estos datos se confirmaron para el total de la población ($n=30$). Así la resistencia de membrana aumentó significativamente tras 5 minutos de aplicación de HC respecto a la situación control ($188,4 \pm 19,0$ M Ω vs $214,9 \pm 24,3$ M Ω). Sin embargo, a los 15 y 30 minutos de actuación del oxidante la resistencia disminuyó significativamente respecto a la situación control y a los 5 minutos de aplicación del HC ($135,3 \pm 16,2$ M Ω y $120,7 \pm 16,7$ M Ω , respectivamente). Los valores a los 30 minutos, aunque fueron ligeramente inferiores a los de 15 minutos, no llegaron a ser estadísticamente diferentes a éstos últimos (Figura 5.2.F; Tabla 5.1).

5.3. Efectos del hidróperóxido de cumeno sobre la reobase y el voltaje de despolarización en neuronas piramidales de la corteza motora.

La administración de HC 10 μ M provocó cambios en la reobase de las neuronas piramidales de la corteza motora. La figura 5.3.A-D ilustra, en una neurona representativa, la respuesta del potencial de membrana a la corriente despolarizante que genera un potencial de acción (reobase), en las condiciones control y a los 5, 15 y 30 minutos de la exposición al HC. La reobase, que en la situación de control fue de 220 pA (Figura 5.3.A), disminuyó a los 5 minutos hasta 160 pA (Figura 5.3.B). Posteriormente, aumentó a valores de 320 y 340 pA a los 15 y 30 minutos, respectivamente (Figura 5.3.C-D). Los valores medios de reobase de la población total de neuronas registradas ($n=30$) en el estudio se recogen en la figura 5.3.E y en la tabla 5.1. Así, la reobase disminuyó significativamente tras 5 minutos de aplicación de HC respecto a la situación control ($176,5 \pm 22,4$ pA vs $156,0 \pm 20,9$ pA), mientras que aumentó significativamente respecto a esta situación y al control a los 15 y 30 minutos de actuación del oxidante ($278,7 \pm 40,2$ pA y $287,9 \pm 44,3$ pA respectivamente). Los valores a los 30 minutos, aunque fueron ligeramente

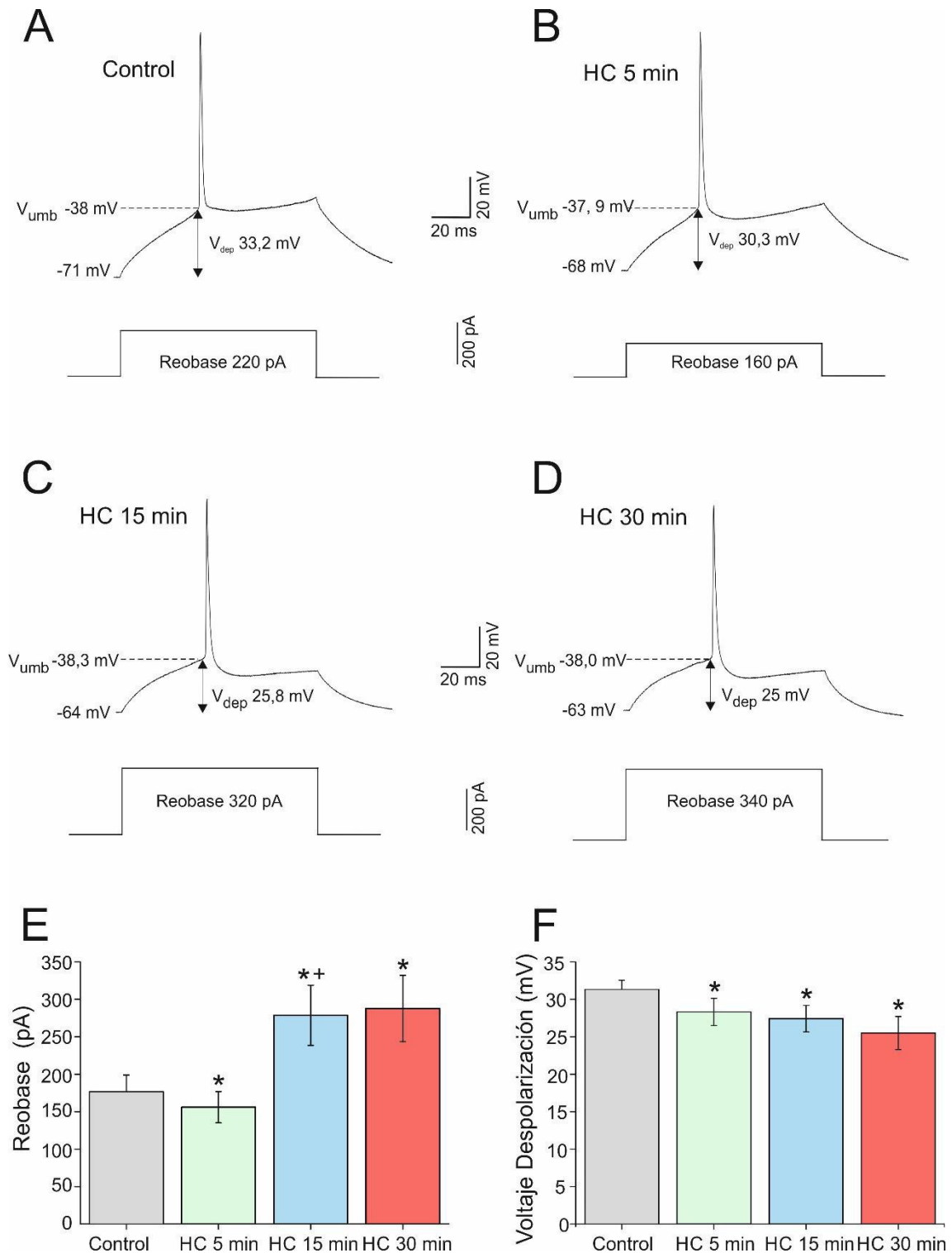


Figura 5.3. Efectos del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre la rebase y el voltaje de despolarización (V_{dep}) en neuronas piramidales de la corteza motora. **A-D.** Respuesta del potencial de membrana a su corriente rebase (a la menor intensidad de corriente a la que da el primer potencial de acción). Nótese que el voltaje umbral (V_{umb}) no se modifica. **E-F.** Histograma donde se representan los valores medios de rebase (E) y voltaje de despolarización (F).

superiores a los obtenidos a los 15 minutos, no llegaron a ser estadísticamente diferentes a éstos (Figura 5.3.E; Tabla 5.1). Los cambios encontrados en la reobase cursaron en paralelo a los cambios encontrados en la resistencia de membrana descritos en el apartado anterior, y de ahí que concluyamos que en todo momento los cambios en la corriente reobase son consecuencia de la bajada en la resistencia de la membrana siguiendo la ley de Ohm.

La figura 5.3.A-D muestra además los cambios encontrados en el voltaje de despolarización. Para este ejemplo, el voltaje disminuyó progresivamente desde 33,2 mV en la situación control hasta 25,0 mV tras 30 minutos de exposición al HC. En general, para el total de la población estudiada, la exposición a HC provocó una disminución en el voltaje de despolarización que fue significativo tras 5 minutos de actuación del HC ($31,3 \pm 1,2$ mV vs. $28,3 \pm 1,8$ mV). Posteriormente y aunque los valores de voltaje fueron disminuyendo a los 15 ($27,4 \pm 1,8$ mV) y 30 ($25,5 \pm 2,2$ mV) minutos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los 5 minutos (Figura 5.3.F; Tabla 5.1).

Finalmente, en la figura 5.3.A-D también se puede observar cómo la aplicación de HC al baño no produjo cambios en el voltaje umbral de la célula mostrada. De hecho, no se encontraron diferencias significativas entre el control y las distintas medidas realizadas tras la aplicación de HC (Tabla 5.1). De estos resultados podemos concluir que la disminución del voltaje de despolarización no es un efecto que se deba a la disminución del voltaje umbral, sino más bien es consecuencia de la despolarización producida en el potencial de membrana tras la administración de HC que se ha descrito anteriormente en el apartado 5.1.

5.4. Efectos del hidroperóxido de cumeno sobre la amplitud y la duración del potencial de acción en neuronas piramidales de la corteza motora.

Las neuronas piramidales de la corteza motora no generan potenciales de acción cuando se registran a su potencial de membrana en reposo. Estos se obtuvieron aplicando pulsos de corriente despolarizantes de 100 μ s de duración a intensidades variables, en el rango de 10 a 20 nA. En la figura 5.4.A se muestran los potenciales de acción de una neurona representativa obtenidos en la situación control y a los 5, 15 y 30 minutos de la exposición al HC. En los registros se observa que el HC produjo una disminución progresiva de la amplitud de la espiga del potencial de acción. En situación control la amplitud fue de 115 mV, mientras que a los 5 minutos bajó a 104 mV, a los 15 minutos a 98 mV y, por último, a los 30 minutos a los 90 mV. Los valores promedio para toda la población estudiada de neuronas piramidales de la corteza motora se muestran en la figura 5.4.B. En situación control la amplitud media fue $118,0 \pm 0,5$ mV, a los 5

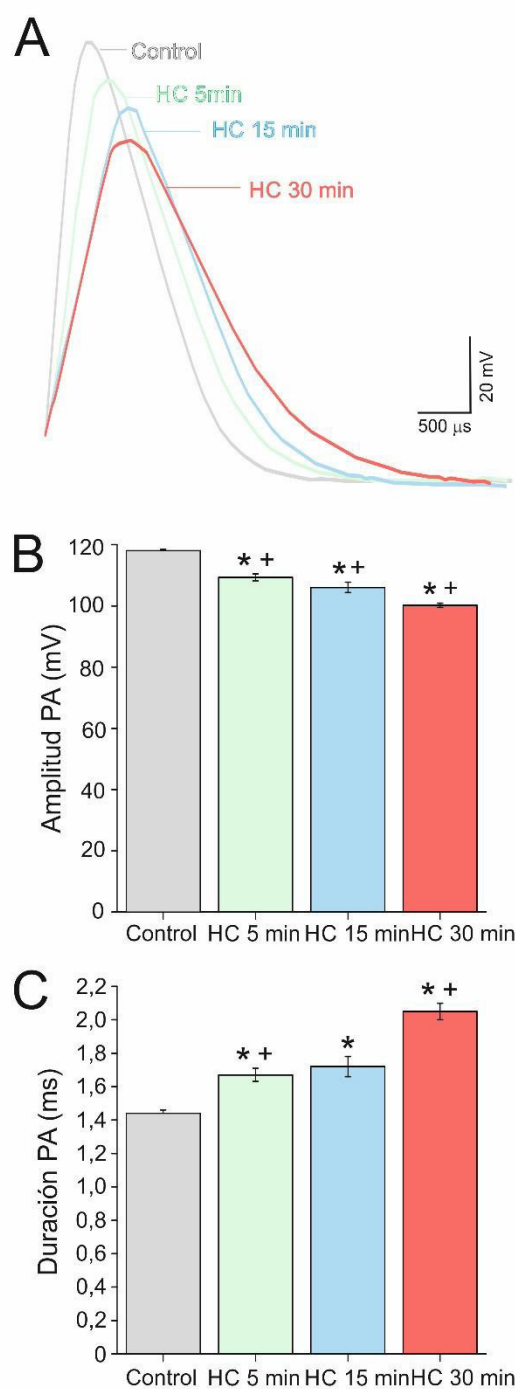


Figura 5.4. Efectos del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre la amplitud y la duración del potencial de acción en neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Respuesta del potencial de membrana a pulsos de corriente despolarizante de 100 μ seg de duración. Los potenciales de acción obtenidos en la situación control, y a 5, 15 y 30 minutos tras la exposición al HC se muestran superpuestos alineados al comienzo del potencial. **B-C.** Histogramas representando los cambios en la amplitud (B) y en la duración (C) del potencial de acción (PA).

minutos tras la exposición al oxidante $109,3 \pm 1,1$ mV, a los 15 minutos $106,0 \pm 1,7$ mV y a los 30 minutos $100,2 \pm 0,7$ mV. Esta bajada en amplitud alcanzó niveles estadísticos a los cinco minutos de exposición al HC y siguió bajando con significación estadística entre los 5 y 15 minutos, y entre los 15 y 30 minutos (Figura 5.4.B; Tabla 5.1). En la figura 5.4.A también se pueden observar los cambios producidos por la administración de HC en la duración del potencial de acción. En dicha figura se puede observar cómo se produce un ensanchamiento progresivo del potencial de acción. En la neurona mostrada en figura 5.4.A, en situación control la duración del potencial fue 1,40 ms; a los 5 minutos 1,57 ms; a los 15 minutos 1,68 ms; y a los 30 minutos 1,98 ms. Esta pauta descrita en la neurona de la figura 5.4. también se observa en los valores promedio del conjunto de la población estudiada que se muestran en la figura 5.4.C. El HC produjo un aumento progresivo de la duración del potencial de acción a lo largo del tiempo de exposición, desde un valor de $1,44 \pm 0,02$ ms en situación control, hasta $1,67 \pm 0,04$ ms a los 5 minutos, $1,72 \pm 0,07$ ms a los 15 minutos y, por último, $2,05 \pm 0,09$ ms a los 30 minutos. Al igual que ocurrió con la amplitud del potencial de acción el aumento en duración fue significativo a los cinco minutos. No obstante, aunque los valores a los 15 minutos tras la aplicación del oxidante fueron ligeramente superiores a los de 5 minutos estos no alcanzaron nivel estadístico, algo que sí se consiguió al comparar el valor medio entre los 15 y 30 minutos.

5.5. Efectos del hidropéroxido de cumeno sobre las propiedades repetitivas de disparo en neuronas piramidales de la corteza motora.

El efecto del HC se estudió en distintos parámetros relacionados con las propiedades de disparo repetitivo: ganancia de la relación intensidad-frecuencia de disparo de potenciales de acción (relación I-F), frecuencia máxima de disparo y corriente de cancelación. En general, las neuronas piramidales estudiadas presentaron en condiciones control un disparo de potenciales de acción fásico-tónico en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes de larga duración (1 s), independientemente de la intensidad de la corriente aplicada. Este disparo se caracterizó por presentar al inicio del pulso un doblete de potenciales de acción seguido de un disparo estable sostenido (Figura 5.5.A y 5.6.A). No obstante, el 43% de las células registradas (13/30) no fueron capaces de disparar de forma repetitiva durante todo el pulso, a ninguna intensidad de corriente, tras la aplicación de HC. Este fenómeno se observa con claridad en la figura 5.5.A-D, en la que se muestra la respuesta del potencial de membrana de una neurona piramidal cuando se le aplicó un pulso de 500 pA de intensidad en las distintas situaciones del estudio. En la situación control la neurona es capaz de rellenar todo el pulso de 1 segundo de duración con potenciales de acción (Figura 5.5.A). Sin embargo, a partir de los 5 minutos se observa que deja de disparar cerca del final del pulso (Figura 5.5.B). Este cese del disparo repetitivo ocurrió, en el ejemplo ilustrado, en

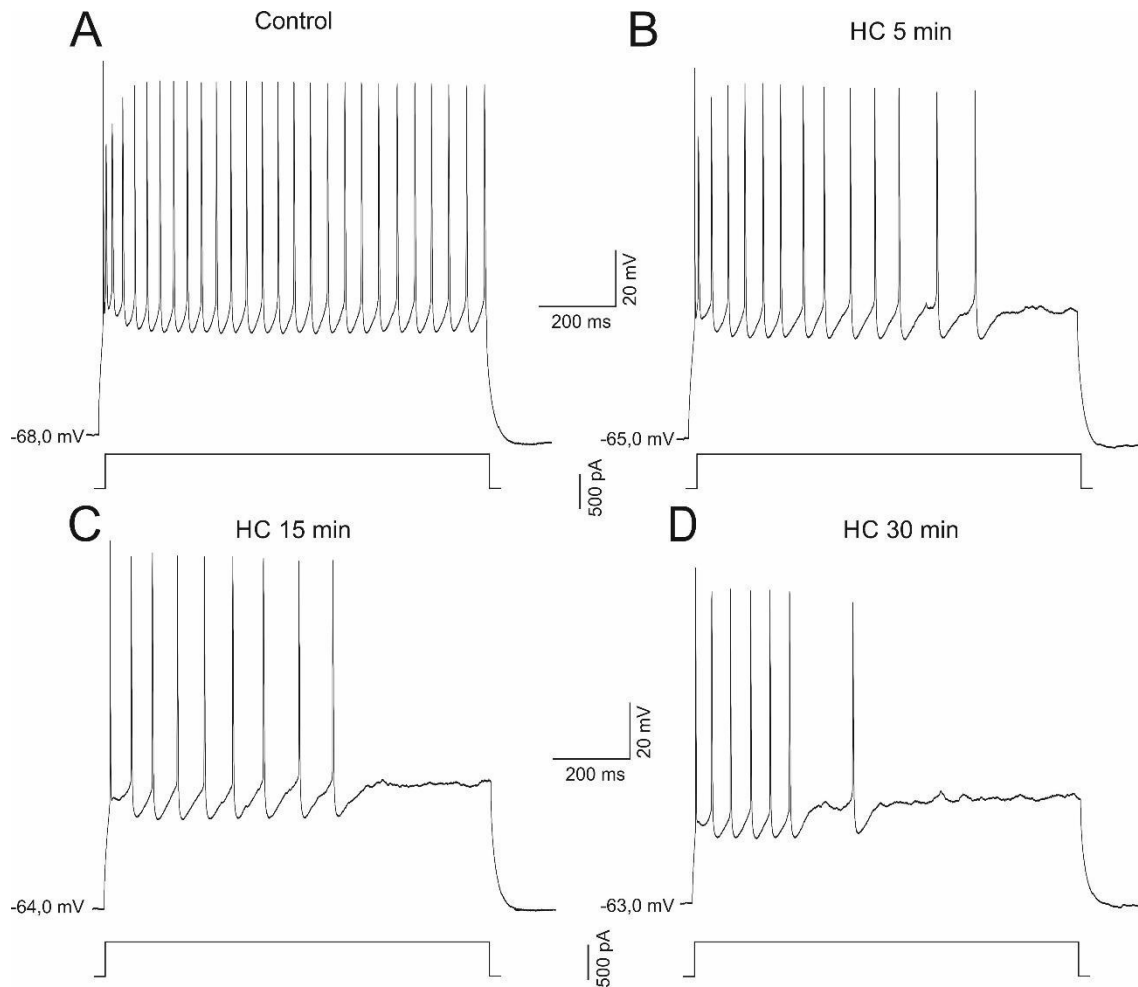


Figura 5.5. Efectos del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre la capacidad de mantener las propiedades repetitivas de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora. A-D. Respuestas del potencial de membrana a pulsos de corriente despolarizante de 1 s de duración y 500 pA de intensidad en situación control (A) y a 5 (B), 15 (C) y 30 (D) minutos tras la aplicación de HC. Nótese que el patrón de disparo repetitivo de potenciales de acción desaparece con la aplicación de HC.

la mitad del pulso a los 15 minutos (Figura 5.5.C) y al principio del pulso a los 30 minutos de la aplicación de HC (Figura 5.5.D). En estos registros también se observa una disminución progresiva de la amplitud de los potenciales de acción, que es más evidente a los 30 minutos. Las neuronas que no fueron capaces de disparar de forma repetitiva a ninguna intensidad de corriente tras la aplicación del HC fueron descartadas para los siguientes estudios.

En un 57% (17/30) de las células estudiadas, se mantuvieron las propiedades repetitivas de disparo a lo largo de todo el pulso aplicado tras la administración de HC. En estas neuronas se estudió el efecto del HC sobre la ganancia del disparo repetitivo, la corriente de cancelación y la frecuencia máxima. Para estudiar estos parámetros se aplicaron pulsos de corriente

despolarizante de 1 segundo de duración y de intensidades crecientes. En la figuras 5.6.A-D se muestra un ejemplo representativo de las respuestas del potencial de membrana a pulsos de corriente despolarizante de una intensidad de 400 pA, en situación control (A) y a 5 (B), 15 (C) y 30 (D) minutos de exposición al HC. Como se muestra en la figura, aunque la neurona mantiene las propiedades repetitivas de disparo de potenciales de acción a lo largo de todo el pulso aplicado, el número de potenciales va disminuyendo a medida que transcurre el tiempo de exposición al HC. En situación control la célula fue capaz de dar 23 potenciales de acción, pero a partir de aquí se observó una disminución progresiva en este número, dado que a los 5 minutos solo fue capaz de dar 16 potenciales de acción, a los 15 minutos ya solo presentaba 13 potenciales de acción y a los 30 minutos 10 potenciales de acción. Estos datos sugirieron que la aplicación del HC podría estar afectando a la ganancia de disparo de estas células.

Con el conjunto de datos obtenidos tras la aplicación de pulsos de intensidad creciente se puede calcular la ganancia de disparo para cada neurona. En la figura 5.6.E se representa la relación existente entre la intensidad de la corriente del pulso aplicado y el número de potenciales de acción que es capaz de dar la célula en las distintas situaciones objeto de estudio (relación I/F). En esta figura puede verse cómo la relación es prácticamente lineal entre ambos parámetros, tanto en la situación control como en presencia de HC, cuando se utilizan intensidades bajas de corriente (pudiendo trazarse una línea recta que une los diferentes puntos). No obstante, cuando se aumenta dicha intensidad aparecen síntomas de acomodación, es decir, la célula difícilmente puede aumentar más la tasa de disparo, aunque se aumente el nivel de intensidad del pulso aplicado. Para calcular la ganancia, que se calcula como la pendiente de la relación existente entre intensidad y frecuencia de disparo, se descartaron los valores que mostraron acomodación. En la figura 5.6.E la neurona empieza a acomodar el disparo a 800 pA en situación control y a los 5 minutos de exposición al HC, y a 650 pA a los 15 y 30 minutos. Estos datos indican que el rango de intensidades de trabajo de la neurona disminuye con la aplicación del HC. Cuando se calculó la ganancia de la neurona representada en la figura 5.6.A-E, se observó que este parámetro disminuyó tras la aplicación de HC. En la célula representada en la figura los valores obtenidos fueron $56 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ en la situación control, $41 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ a los 5 minutos, $36 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ a los 15 minutos y $26 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ a los 30 minutos. Esta observación es aplicable al total de la población de neuronas piramidales registradas que lograron mantener las propiedades repetitivas de disparo (17/30). En la figura 5.6.F y tabla 5.1 se representan los valores medios de ganancia en las distintas situaciones: en la situación control la ganancia media de la población fue de $44,1 \pm 5,9 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$, a los 5 minutos de la exposición al HC fue $37,4 \pm 9,0 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$, a los 15 minutos

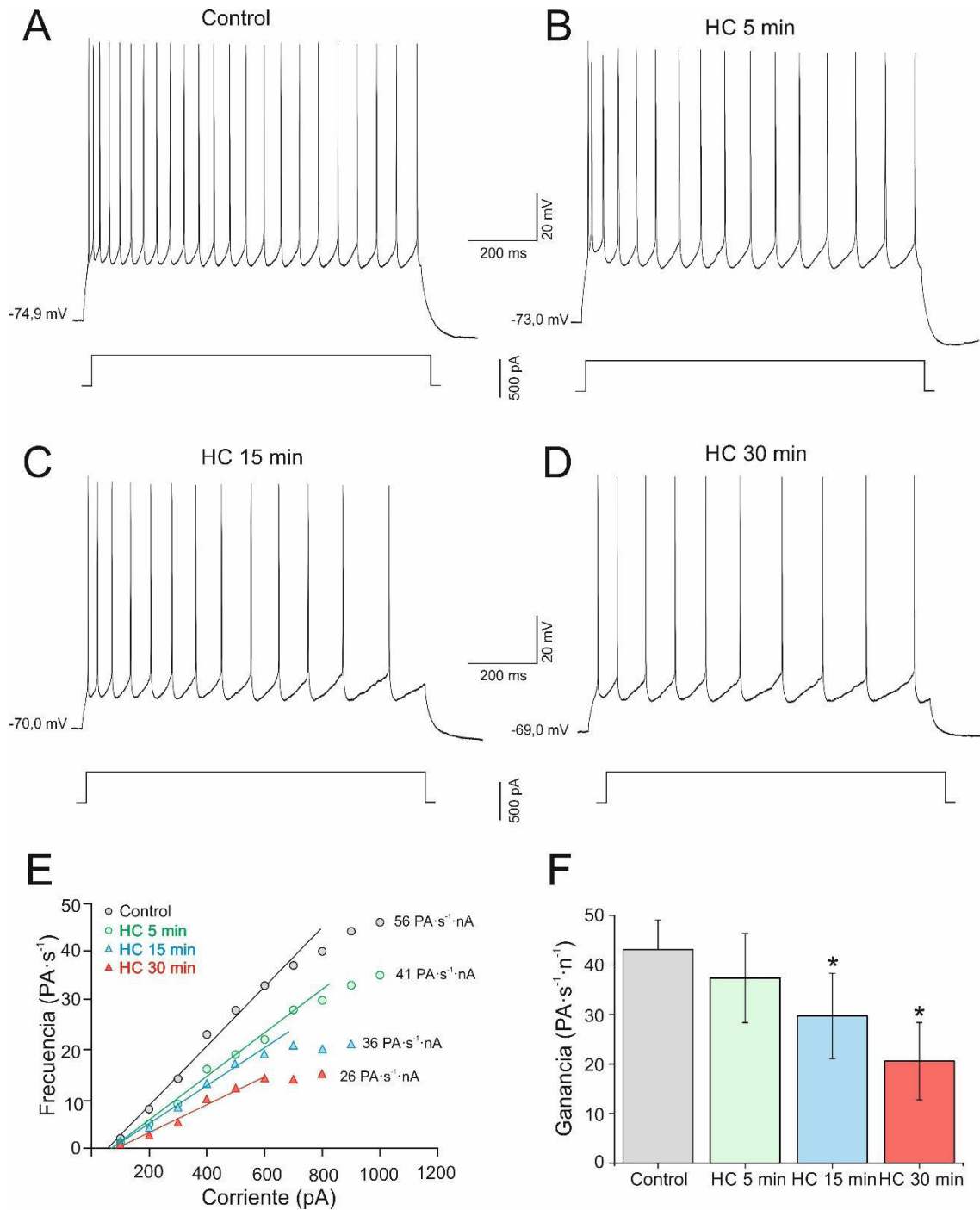


Figura 5.6. Efectos del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre la ganancia de las propiedades repetitivas de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora. **A-D.** Respuestas del potencial de membrana a pulsos de corriente despolarizante de 1 s de duración y 400 pA de intensidad en situación control (**A**) y a 5 (**B**), 15 (**C**) y 30 (**D**) minutos. **E.** Relación entre la intensidad de la corriente del pulso aplicado y el número de potenciales de acción (PA) que es capaz de dar la célula, analizada en las distintas situaciones representada en **A-D**. **F.** Histograma representando los cambios en ganancia.

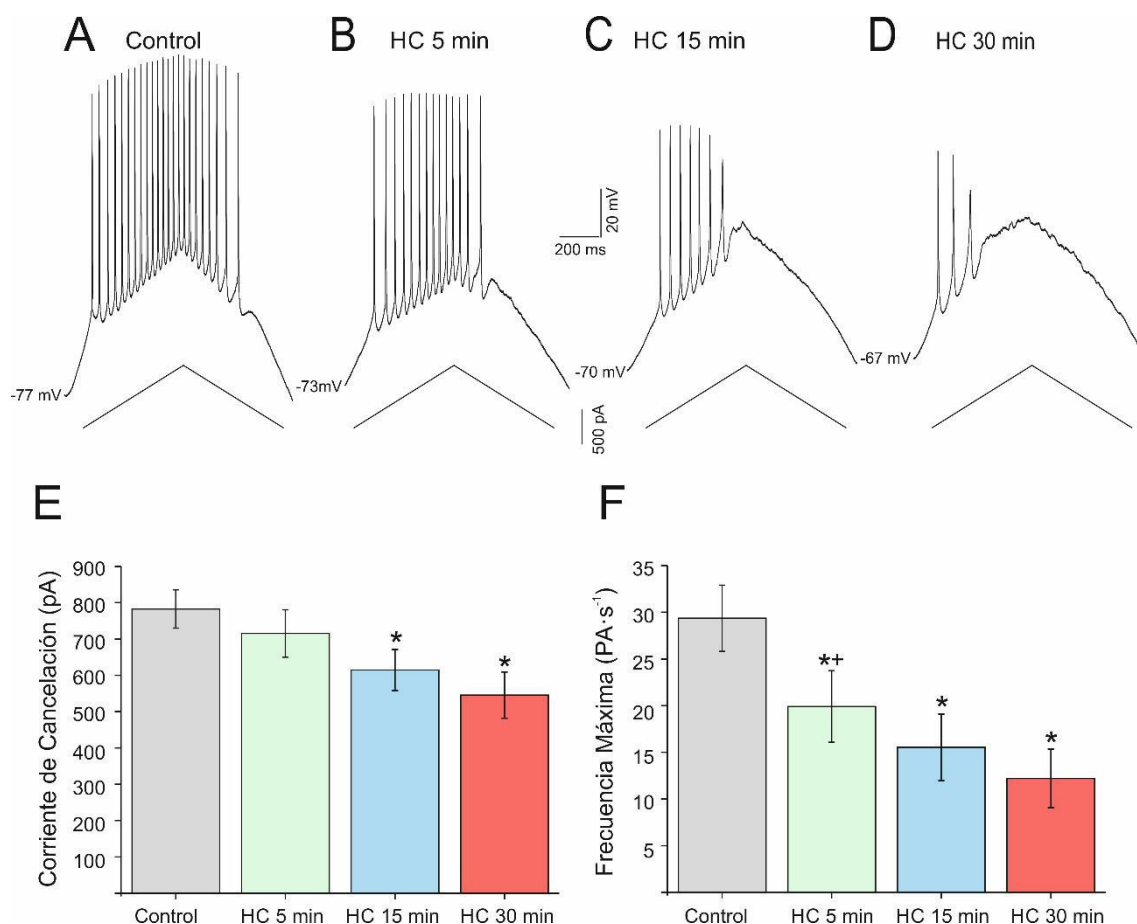


Figura 5.7. Efectos del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre la corriente de cancelación y la frecuencia máxima de disparo de potenciales de acción en neuronas piramidales de la corteza motora. A-D. Respuestas del potencial de membrana a pulsos triangulares de corriente despolarizante de 1 s de duración y 900 pA de intensidad en situación control (A) y a 5 (B), 15 (C) y 30 (D) minutos. E-F. Histogramas representando los cambios en la corriente de cancelación (E) y la frecuencia máxima (F).

29,7±8,6 PA·s⁻¹·nA⁻¹ y a los 30 minutos 20,6±7,8 PA·s⁻¹·nA⁻¹. Este decremento observado en la ganancia por la exposición continuada al HC alcanzó el nivel de significación estadística a los 15 minutos (Tabla 5.1).

Otro parámetro que se analizó fue la corriente de cancelación, o corriente mínima a la que se observa la cancelación del patrón de disparo de potenciales de acción de la neurona (Figura 5.7.A-E), en aquellas células (17/30) que mantuvieron el disparo repetitivo al aplicarles pulsos cuadrados de corriente de 1 s de duración. Hay que hacer constar que el que las células cancelen el disparo repetitivo al aumentar la intensidad de la corriente inyectada no es consecuencia de utilizar pulsos cuadrados de larga duración. El mismo fenómeno se puede poner de manifiesto al inyectar pulsos triangulares (ver figura 5.7.A-D). En el ejemplo mostrado en la

figura 5.7.A-D, se inyectó un pulso triangular de intensidad creciente (0-900 pA) de 1 s de duración y se observó que la célula mantuvo el disparo repetitivo en situación control y a los 5 min en HC, pero no a los 15 o 30 minutos. Esta figura indica que la cancelación del disparo repetitivo ocurre a intensidades más bajas a medida que aumentamos el tiempo de exposición al HC. Un análisis más detallado se muestra en la figura 5.7.E en la que se muestran los valores promedios de la población estudiada ($n=17$). En situaciones control la cancelación del disparo se observó a intensidades de corriente de $782,7 \pm 52,8$ pA. Progresivamente la intensidad fue descendiendo: a los 5 minutos la media fue de $715,2 \pm 65,1$ pA, a los 15 minutos de $614,6 \pm 56,8$ pA y a los 30 minutos de $545,2 \pm 63,8$ pA. Se encontraron diferencias estadísticas a los 15 minutos tras la exposición al oxidante (Tabla 5.1).

Una manifestación adicional del estrechamiento del rango de trabajo de las neuronas por efecto del HC se pudo observar al medir la frecuencia máxima de disparo (que coincide con el valor de frecuencia a la que la neurona presenta acomodación completa). Al igual que se ha descrito antes para la ganancia, la frecuencia máxima disminuyó progresivamente tras la administración del HC (Figura 5.7.F). Esta disminución fue estadísticamente significativa a los 5 minutos tras la aplicación del oxidante ($29,3 \pm 3,5$ PA·s⁻¹ vs. $19,9 \pm 3,8$ PA·s⁻¹). Posteriormente, aunque los valores de frecuencia siguieron disminuyendo a los 15 y a los 30 minutos no fueron estadísticamente diferentes entre ellos (Tabla 5.1).

PROPIEDADES DE MEMBRANA	CONTROL	HC (5 min)	HC (15min)	HC (30 min)
Potencial de Membrana (mV)	-70,7 \pm 1,3	-67,0 \pm 1,3*+	-65,1 \pm 1,7*	-64,2 \pm 1,4*
Resistencia (MΩ)	188,4 \pm 19,0	214,9 \pm 24,3*+	135,3 \pm 16,2*+	120,7 \pm 16,
Reobase (pA)	176,5 \pm 22,4	156,0 \pm 20,9*+	278,7 \pm 40,2*+	287,9 \pm 44,3*
Voltaje de Despolarización (mV)	31,3 \pm 1,2	28,3 \pm 1,8*+	27,4 \pm 1,8*	25,5 \pm 2,2
Voltaje Umbral (mV)	-39,4 \pm 1,6	-38,8 \pm 2,0	-38,9 \pm 2,2	-38,7 \pm 2,4
Amplitud PA (mV)	118,0 \pm 0,5	109,3 \pm 1,1*+	106,0 \pm 1,7*+	100,2 \pm 0,7
Duración PA (ms)	1,44 \pm 0,02	1,67 \pm 0,04*+	1,72 \pm 0,07*	2,05 \pm 0,09*+
Ganancia (PA·s⁻¹·nA⁻¹)	44,1 \pm 5,9	37,4 \pm 9,0	29,7 \pm 8,6*	20,6 \pm 7,8
Frecuencia Máxima (PA·s⁻¹)	29,3 \pm 3,5	19,9 \pm 3,8*+	15,5 \pm 3,5*	12,2 \pm 3,1*
Corriente de Cancelación (pA)	782,7 \pm 52,8	715,2 \pm 65,1	614,6 \pm 56,8*	545,2 \pm 63,

Tabla 5.1. Efectos del hidróperóxido de cumeno (HC) sobre las propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales de la corteza motora. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las condiciones control; las cruces indican diferencias entre columnas adyacentes (test de la *t* de Student para muestras pareadas). El nivel de significancia se establece en $P < 0.05$. Todos los datos se muestran como la media \pm error estándar de la media.

A continuación, demostramos que los efectos anteriormente descritos sobre las propiedades pasivas y activas de la membrana de las neuronas piramidales no son un artefacto debido al registro de larga duración (30 minutos) en la configuración de *patch-clamp* de célula entera. Como se observa en la figura 5.8.A, el potencial de membrana permanece estable en torno a los -74 mV durante toda la sesión de registro y la célula respondió a una inyección de corriente (-100 pA) con cambios similares en voltaje. La resistencia de membrana se calculó a partir de dichos cambios en voltaje y dio como resultados 210, 205, 209 y 210 MΩ, para los minutos 1, 5, 15 y 30 del registro respectivamente (ver las flechas en la Figura 5.8.A). Para el conjunto de todas las neuronas registradas (n=20), los valores medios obtenidos al comienzo de la sesión de registro y a los minutos 5, 15 y 30 no mostraron ninguna diferencia significativa en potencial de membrana, resistencia de membrana, amplitud del potencial de acción, ganancia o frecuencia máxima de disparo.

5.6. Efectos del lavado de hidropéroxido de cumeno sobre la resistencia de membrana y el potencial de membrana en reposo de las neuronas piramidales de la corteza motora.

A continuación, nos preguntamos si el efecto del HC sobre las propiedades de membrana desaparecía al retirar (lavar) el oxidante del medio de perfusión, o si por el contrario se mantenía. En primer lugar, se estudió la aplicación de 5 minutos de HC. La figura 5.8.B ilustra el efecto sobre el potencial de membrana de la aplicación de 5 minutos de 10 μM de HC y el posterior lavado del oxidante. El registro muestra cómo la célula empezó a despolarizarse en el minuto 3 alcanzando un máximo de despolarización, aproximadamente 6 mV, en el minuto 8. A continuación, la despolarización se mantuvo estable hasta el minuto 12. Posteriormente, el potencial de membrana comenzó a repolarizarse progresivamente, alcanzando un valor similar al registrado en la situación control (-68 mV) al minuto 15 de la sesión de registro (minuto 10 desde el comienzo del lavado). Posteriormente, el potencial de membrana mantuvo dicho valor hasta el final del experimento (minuto 30). Del conjunto de 10 células estudiadas, encontramos que el potencial de membrana se repolarizó por completo en un total de 5 células. Para las otras 5 células estudiadas solo se observó una repolarización parcial (<60% del cambio producido por el HC).

A continuación, estudiamos el efecto del lavado del HC sobre la resistencia de membrana. Para conseguir este objetivo, aplicamos pulsos de corriente negativa (-100 pA, 200 ms) a intervalos de un minuto y registramos la respuesta en voltaje. El HC, como hemos visto anteriormente, produce un cambio bifásico en la resistencia de membrana, caracterizado por un

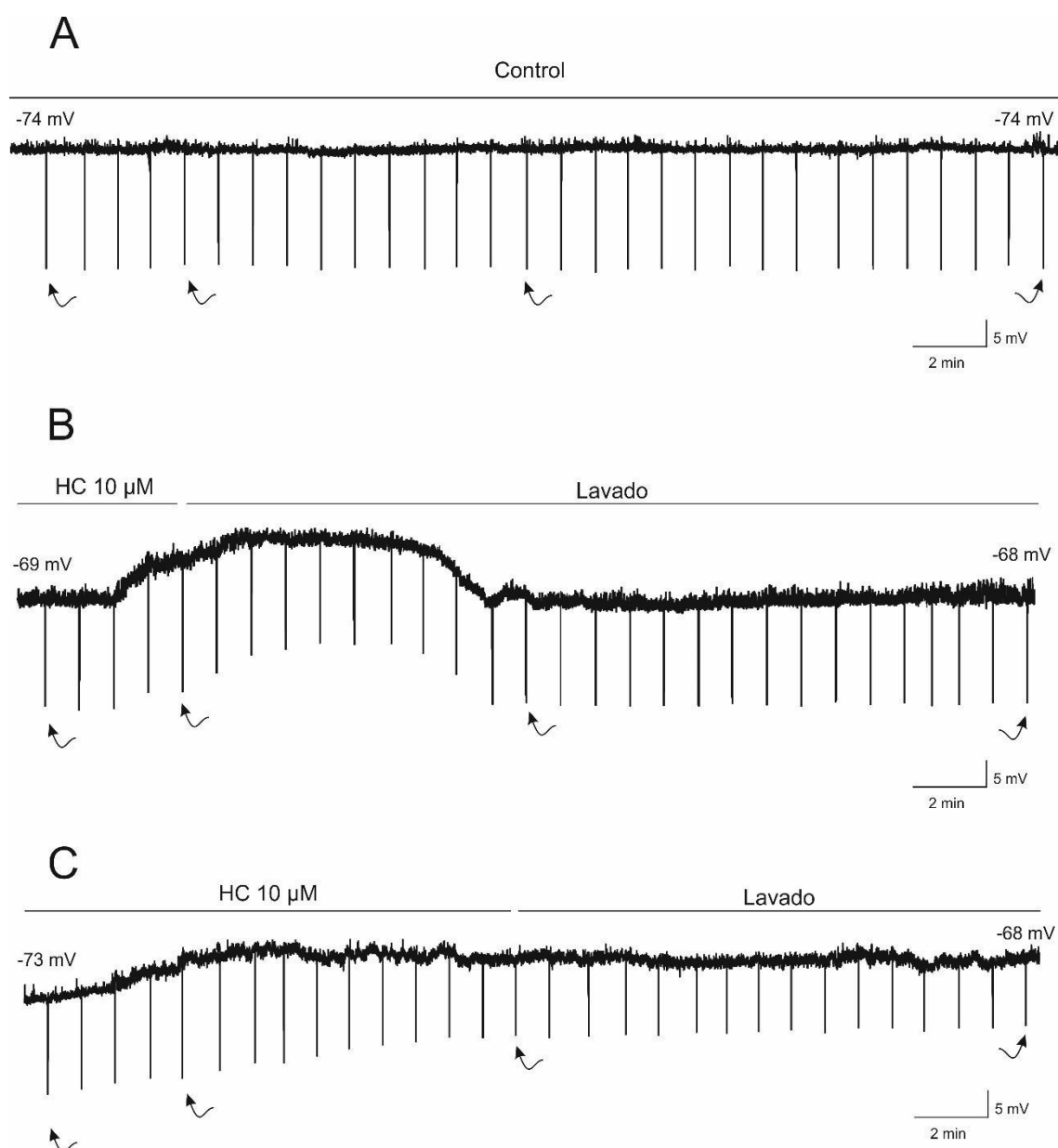


Figura 5.8. Efectos del lavado del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre el potencial de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora. A. Registro electrofisiológico en el que se muestra que tanto el potencial de membrana como la respuesta en voltaje a pulsos de corriente negativa de -100 pA permanece estable durante 30 minutos en situación control. **B.** Lavado del HC tras 5 minutos de aplicación del oxidante (10 μM). **C.** Lavado del HC tras 15 minutos de aplicación del oxidante (10 μM).

incremento transitorio en el minuto 5 desde la aplicación del oxidante que después disminuye progresivamente hasta valores por debajo de los registrados en situación control. En la figura 5.8.B, la resistencia cambió de 184 MΩ, en situación control, hasta 223 MΩ en el minuto 5. Después, fue disminuyendo progresivamente hasta alcanzar 180 MΩ tras 15 minutos de registro (minuto 10 de lavado, indicado por la tercera flecha en la figura). Este valor permaneció invariable durante 20 minutos de registro (minuto 15 de lavado). En el minuto 30 de registro, el valor de la resistencia fue 181 MΩ (cuarta flecha en la figura). Un total de 6/10 células presentaron el mismo

resultado, mientras el resto mostraron valores de resistencia de membrana por debajo de los registrados al comienzo del experimento. Esta bajada en la resistencia por debajo del valor control puede ser debida al efecto tardío del HC sobre la resistencia y no necesariamente al lavado del oxidante en sí.

También quisimos ver el efecto del lavado sobre las propiedades repetitivas de disparo. Tras una exposición al HC de 5 minutos, todas las células ($n=10$) del estudio presentaron un descenso en la ganancia ($55,2 \pm 12,6$ AP·s $^{-1}$ ·nA $^{-1}$ vs $36,7 \pm 15,5$ AP·s $^{-1}$ ·nA $^{-1}$). Tras el lavado, 4 células mostraron una mejoría en la ganancia y la frecuencia máxima de disparo ($< 40\%$ del cambio). Cuatro neuronas no presentaron ningún tipo de reversibilidad de los efectos del HC y mantuvieron una ganancia y una frecuencia máxima de disparo más bajas que los valores de la situación control. Las 2 células restantes perdieron por completo la capacidad para disparar potenciales de acción de manera repetitiva durante el lavado. De estos experimentos, pudimos concluir que una corta exposición al oxidante (5 minutos) permite una recuperación parcial de los efectos que el HC puede tener sobre el potencial de membrana, la resistencia y las propiedades repetitivas de disparo. A continuación, nos preguntamos si los efectos del HC se podrían también revertir si lavamos el oxidante tras una exposición de mayor duración, 15 minutos. En la figura 5.8.C se muestra cómo tras la aplicación de HC durante 15 minutos la célula no presentó ninguna recuperación en los parámetros analizados en el estudio. Para la neurona representada en la figura, el potencial de membrana se despolarizó desde un valor de -73 mV hasta -68 mV tras 15 minutos de aplicación de HC, y este valor permaneció estable hasta el final del registro (15 minutos de lavado). Lo mismo ocurrió en el conjunto de neuronas estudiadas ($n=10$). La célula ilustrada en la figura mostró un valor de 166 M Ω en situación control que aumentó hasta los 202 M Ω tras 5 minutos y disminuyó hasta 141 M Ω a los 15 minutos de aplicación de HC. El lavado del oxidante no produjo ninguna recuperación hacia los valores iniciales de resistencia, más bien al contrario, la resistencia continuó descendiendo hasta los 112 M Ω al final de la sesión de registro. Este fenómeno fue observado en el conjunto de la población estudiada. Así el valor de resistencia obtenido tras el lavado del oxidante fue menor a la de la situación control, lo que es característico de la propia aplicación del HC. En términos de ganancia y frecuencia máxima de disparo, solo 3 células mostraron una tendencia de recuperación de los valores iniciales (30% de recuperación) durante el lavado, mientras las 7 restantes neuronas mantuvieron la disminución en ambos parámetros. Tres de estas últimas neuronas perdieron completamente su capacidad de disparar repetitivamente y no se recuperaron durante el lavado. Estos resultados nos llevaron a concluir que la exposición prolongada a HC (15 minutos) produce alteraciones en las propiedades de membrana que son difícilmente reversibles.

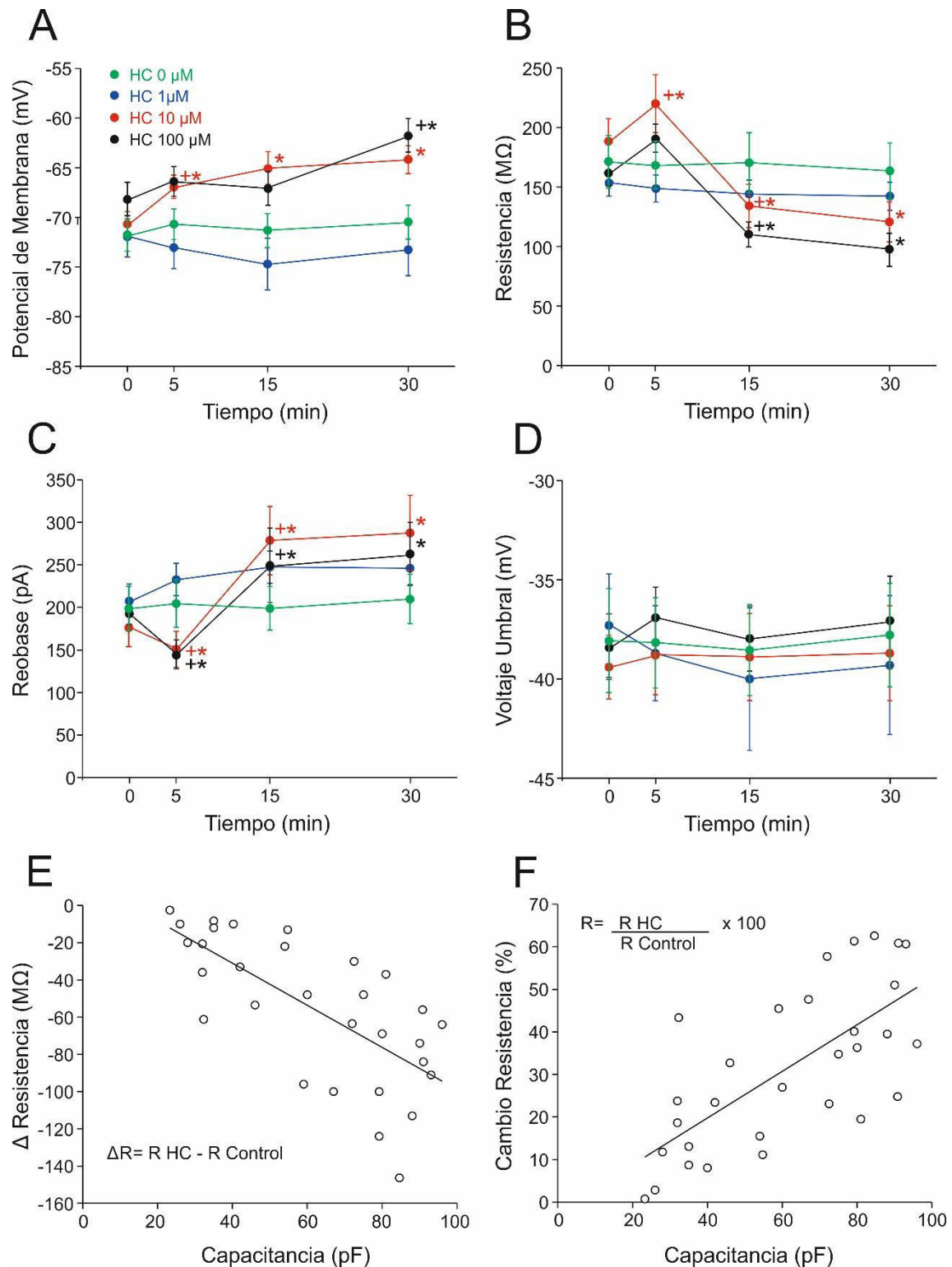


Figura 5.9. Efectos dosis, tiempo y tamaño dependientes del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre las neuronas piramidales de la corteza motora. A-D. Gráficos que muestran los efectos dosis y tiempo dependientes del HC sobre el potencial de membrana (A), la resistencia (B), reobase (C) y voltaje umbral (D). Estos gráficos ilustran los valores medios ± el error estándar a los 0, 5, 15 y 30 minutos en condición control (verde; n=20) y tras la exposición a HC 1 μM (azul; n=30), 10 μM (rojo; n=30) y 100 μM (negro; n=30). E-F. Relación entre la capacitancia y el cambio en la resistencia (R) en valores absolutos (E) y relativos (F) tras 30 minutos de aplicación de HC 100 μM.

5.7. Efectos dosis dependiente del hidroperóxido de cumeno sobre las propiedades de membrana de las células piramidales de la corteza motora.

A continuación, realizamos un estudio dosis respuesta a lo largo del tiempo de los efectos del HC sobre las propiedades de membrana de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora. Nos preguntábamos si al aplicar una concentración 10 veces menor a la usada anteriormente (1 μM) o diez veces mayor (100 μM) se obtendrían resultados similares a los encontrados con 10 μM . La figura 5.9.A-D muestra los valores medios del potencial de membrana (A), resistencia (B), reobase (C) y voltaje umbral (D) de las neuronas de la corteza motora, a los 0, 5, 15 y 30 minutos de registro, en 4 situaciones diferentes: 1) control o 0 μM (n=20); 2) tratamiento con HC 1 μM (n=30); 3) tratamiento con HC 10 μM (n=30); y 4) tratamiento con 100 μM (n=30). En relación al potencial de membrana, como se muestra en la figura 5.9.A, en las situaciones de control y 1 μM no se encontraron diferencias significativas en el potencial de membrana a lo largo de los 30 minutos de duración del estudio. En cambio, para la concentración de 10 μM el potencial de membrana se despolarizó significativamente en el minuto 5. Aunque los valores de potencial de membrana obtenidos a los 15 y 30 minutos fueron ligeramente más despolarizados, en estos casos las diferencias encontradas no fueron estadísticamente diferentes comparadas con las obtenidas en el minuto 5. Cuando se aplicó la concentración de 100 μM de HC la despolarización fue significativa en el minuto 30 ($-68,6 \pm 1,3$ mV en condiciones iniciales vs $-61,9 \pm 1,4$ mV en el minuto 30).

La figura 5.9.B muestra los efectos sobre la resistencia de membrana. Como se observa en la figura, la resistencia de membrana no varió a lo largo del tiempo en la situación control ni cuando se aplicó 1 μM de HC, durante los 30 minutos de duración del experimento. Sin embargo, la resistencia de membrana mostró un comportamiento bifásico para las otras dos concentraciones con un incremento transitorio en el minuto 5. A continuación se observó un descenso en la resistencia en el minuto 15 y en el 30, que fueron significativos al compararlos con los valores iniciales. Más específicamente, la resistencia aumentó en el minuto 5 de la aplicación de 100 μM de HC ($162,1 \pm 9,5$ M Ω vs $189,2 \pm 12,4$ M Ω). Tras esto, disminuyó a los 15 y 30 minutos: $110,6 \pm 9,8$ M Ω y $99,7 \pm 11,1$ M Ω , respectivamente. Los valores obtenidos en el minuto 30 fueron algo inferiores a los obtenidos en el minuto 15 pero no se encontraron diferencias significativas entre ellos. De estos resultados se puede concluir que el tratamiento con HC 1 μM no produjo ningún efecto sobre el potencial de membrana y la resistencia de las neuronas, mientras que el tratamiento con HC 10 y 100 μM sí lo hizo. Por otro lado, al comparar el efecto del tratamiento con HC 10 y 100 μM no se encontraron diferencias significativas en ningún momento del estudio (0, 5, 15 o 30 minutos) en ninguno de los dos parámetros.

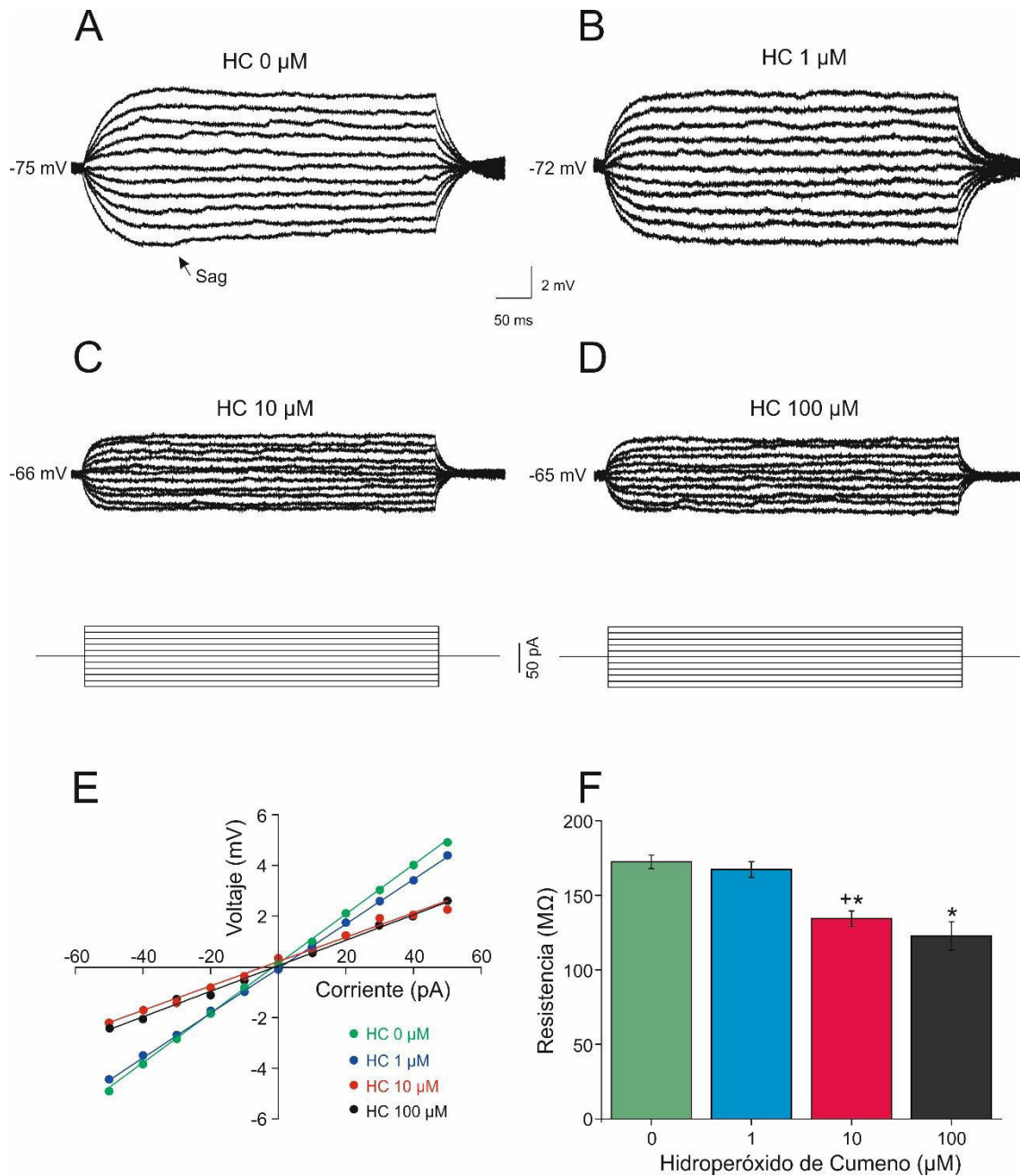


Figura 5.10. Efectos de la aplicación secuencial de dosis crecientes de hidroperóxido de cumeno (HC) sobre la resistencia de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A-D.** Registros que muestran, en la misma célula, las respuestas del potencial de membrana a pulsos cuadrados de corriente de 10 pA sin administración de HC (**A**), tras 10 minutos de aplicación de 1 μM de HC (**B**), tras 10 minutos más con HC 10 μM (**C**) y tras otros 10 minutos más de aplicación de HC 100 μM (**D**). La flecha negra en **A** indica la presencia de sag. **E.** Relación entre la corriente y la respuesta en voltaje de la célula representada en **A-D**. **F.** Histograma que ilustra los valores medios de la resistencia de membrana en condición control y para las otras tres situaciones para toda la población estudiada ($n=10$).

Para comprobar, si efectivamente, no existían diferencias entre la situación control y 1 μM y entre las situaciones de 10 y 100 μM sobre la resistencia de membrana y sobre cualquier de los parámetros fisiológicos medidos, llevamos a cabo otro experimento ($n=10$). En este caso, la misma neurona fue expuesta de forma secuencial a concentraciones crecientes (0, 1, 10 y 100 μM) de HC durante 10 minutos por concentración. La figura 5.10.A-D muestra, para una neurona representativa, la respuesta en voltaje a inyecciones de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes a las 4 concentraciones secuenciales mencionadas anteriormente. Así, se puede observar que las respuestas en voltaje fueron similares antes de la aplicación del oxidante (0 μM de HC) y para la concentración de 1 μM de HC, y demuestra que en esta situación la resistencia de membrana no se modifica. Sin embargo, en situación control en ausencia del oxidante, la neurona (Figura 5.10.A) presenta una rectificación de voltaje del potencial de membrana (conocido como “sag”) aproximadamente a los 80 ms, que desaparece tras la aplicación de 1 μM de HC (Figura 5.10.B). Las respuestas en voltaje obtenidas cuando se aplicó 10 y 100 μM de HC fueron menores que las obtenidas en situación control y a 1 μM . Como hemos descrito ya anteriormente, la medida de la resistencia de membrana para cada neurona, antes de la aplicación del oxidante y para las tres concentraciones usadas en el estudio, se calculó como la pendiente de la relación existente entre la intensidad de corriente y la respuesta en voltaje (Figura 5.10.E). Para la neurona descrita en la figura 5.10.A-D la resistencia obtenida fue de 103 $\text{M}\Omega$ al comenzar la sesión de registro sin HC, y 102 $\text{M}\Omega$ tras la aplicación de 1 μM de HC. A continuación, descendió hasta 51 $\text{M}\Omega$ con la aplicación de 10 μM de HC y hasta 50 $\text{M}\Omega$ con 100 μM de HC (Figura 5.10.E). Para el total de la población ($n=10$) la resistencia de membrana fue de $170,2 \pm 6,1 \text{ M}\Omega$ en situación control (0 μM HC). Este parámetro se mantuvo sin cambios a 1 μM ($165,3 \pm 6,7 \text{ M}\Omega$), para posteriormente disminuir significativamente hasta $135,7 \pm 5,7 \text{ M}\Omega$ con 10 μM de HC y a $120,6 \pm 11,8 \text{ M}\Omega$ con 100 μM de HC (Figura 5.10.F). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se analizaron las medias del potencial de membrana para el conjunto de la población, no encontrándose diferencias significativas entre el control y 1 μM , ni entre 10 y 100 μM (datos no mostrados). Según estos datos podemos concluir que la aplicación durante 10 minutos de HC 1 μM no produce cambios respecto al control en el valor del potencial de membrana ni en la resistencia, aunque se detecta un cierto efecto sobre la rectificación del potencial de membrana a pulsos muy hiperpolarizantes (efectos sobre el sag). Por otro lado, los efectos de la concentración de 100 μM no son significativamente diferentes de los cambios producidos por la administración de 10 μM de HC.

5.8. Efectos dosis dependiente del hidropéroxido de cumeno sobre la reobase y el voltaje umbral de las neuronas piramidales de la corteza motora.

La administración de HC produjo cambios en la reobase de las neuronas piramidales de la corteza motora que fueron dependientes de tiempo y de concentración (Figura 5.9.C). No se observaron cambios significativos sobre la reobase en la situación control (0 μM HC) o tras la perfusión de la rodaja con HC 1 μM durante los 30 minutos del registro. Sin embargo, durante los tratamientos con 10 o 100 μM de HC, la reobase disminuyó significativamente a los 5 minutos en comparación con la situación inicial, incrementándose posteriormente de forma significativa, respecto a la situación control y a los 5 minutos, tras los 15 y 30 minutos de perfusión del oxidante.

En el caso del tratamiento con HC 100 μM la reobase disminuyó durante los 5 primeros minutos desde $193,7 \pm 10,6$ pA a los $149,6 \pm 15,7$ pA, para luego incrementar hasta $249,9 \pm 41,6$ pA tras 15 minutos y $263,1 \pm 35,3$ pA tras 30 minutos de exposición al oxidante. En general, tanto en el tratamiento de 10 μM como en el de 100 μM de HC los valores obtenidos a los 30 minutos de registro solo fueron ligeramente superiores a los obtenidos a los 15 minutos y no se diferenciaron de forma significativa. Los cambios en la reobase fueron paralelos y proporcionales a los cambios ocurridos en la resistencia de membrana, manteniéndose el voltaje umbral sin cambios, en todas las situaciones, durante los 30 minutos de duración del registro (Figura 5.9D). Por tanto, concluimos que la membrana de las neuronas piramidales sigue la Ley de Ohm bajo los efectos de la administración de las distintas concentraciones del oxidante.

Posteriormente, se analizó si los efectos del estrés oxidativo producido por el HC sobre las propiedades de membrana podrían depender del tamaño neuronal, es decir, si las neuronas más grandes presentan una mayor sensibilidad al HC o al contrario. Se puede inferir una estimación del tamaño neuronal a partir de la capacitancia de la membrana, donde las neuronas más grandes tendrían un valor mayor de capacitancia. La figura 5.9.E-F muestra la relación entre la capacitancia y los cambios en resistencia de las neuronas registradas con 100 μM de HC, en valores absolutos (Figura 5.9.E) y en valores relativos (Figura 5.9.F). Los datos muestran una relación lineal entre la capacitancia y el cambio en la resistencia de membrana cuando se calcula tanto en valores absolutos ($P < 0,001$; $r > 0,69$) como en valores relativos ($P < 0,001$; $r > 0,71$). Se obtienen resultados similares cuando se administra 10 μM de HC (no mostrado en las figuras). De estas figuras pudimos concluir que las neuronas piramidales de la corteza motora que tienen una mayor superficie de membrana son más propensas a sufrir alteraciones en sus propiedades eléctricas de membrana por el estrés oxidativo mediado por HC.

5.9. Efectos dependientes de la concentración de hidroperóxido de cumeno sobre las características del potencial de acción de las neuronas piramidales de la corteza motora.

La figura 5.11.A describe los efectos dependientes de la concentración de HC, y del tiempo de exposición al oxidante, sobre la amplitud del potencial de acción en condiciones control (0 μM de HC) y para las 3 concentraciones o tratamientos indicados en la sección anterior (1, 10 y 100 μM de HC). En la situación control, como ya se había demostrado previamente para otros parámetros, no se produjeron efectos dependientes del tiempo sobre la amplitud del potencial de acción durante los 30 minutos del registro. Sin embargo, durante la perfusión con HC 1 μM la amplitud del potencial de acción disminuyó de forma gradual con el tiempo, haciéndose esta disminución estadísticamente significativa respecto al inicio a los 30 minutos del estudio. Para las concentraciones de 10 y 100 μM , la disminución en amplitud fue más evidente y más rápida que lo observado tras la aplicación de 1 μM siendo estadísticamente significativa la disminución a los 5 minutos de registro. Además, la amplitud del potencial de acción continuó disminuyendo de forma progresiva con el tiempo volviendo a alcanzar valores significativamente menores a los 30 minutos de registro. A modo de ejemplo, y para la concentración de 100 μM , en las condiciones iniciales la amplitud media fue de $120,1 \pm 2,0$ mV, descendió hasta $114,8 \pm 5,7$ mV en el minuto 5, y aún más hasta $110,3 \pm 3,8$ mV (minuto 15) y $91,2 \pm 3,3$ mV (minuto 30). La mayor diferencia entre las condiciones inicial y final para la medida de la amplitud fue obtenida cuando se aplicó 100 μM de HC. En concreto, las diferencias en amplitud entre la situación inicial y la medida a los 30 minutos fueron las siguientes: $8,4 \pm 3,9$, $18,8 \pm 2,3$ y $28,9 \pm 5,8$ mV, para 1, 10 y 100 μM de HC, respectivamente. Las diferencias en el efecto sobre el potencial de acción fueron además significativas entre las tres concentraciones en el minuto 30.

En la figura 5.11.B se muestra el efecto dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al HC sobre la duración del potencial de acción. En la situación control no se observó ningún efecto dependiente del tiempo sobre este parámetro, al igual que tampoco se observó a la concentración de 1 μM . En cambio, durante la perfusión con 10 y 100 μM de HC el potencial de acción aumentó progresivamente su duración con el tiempo. Así, se puede observar en esta figura un aumento estadístico en el minuto 5 en comparación con la situación inicial (0 minutos), y en el minuto 30 en comparación con el 15 para las concentraciones de 10 y 100 μM de HC. Por ejemplo, y para la administración de 100 μM , la duración del potencial de acción fue $1,50 \pm 0,11$ ms (minuto 0), $1,82 \pm 0,13$ ms (minuto 5), $1,87 \pm 0,28$ ms (minuto 15) y finalmente $2,31 \pm 0,15$ ms (minuto 30).

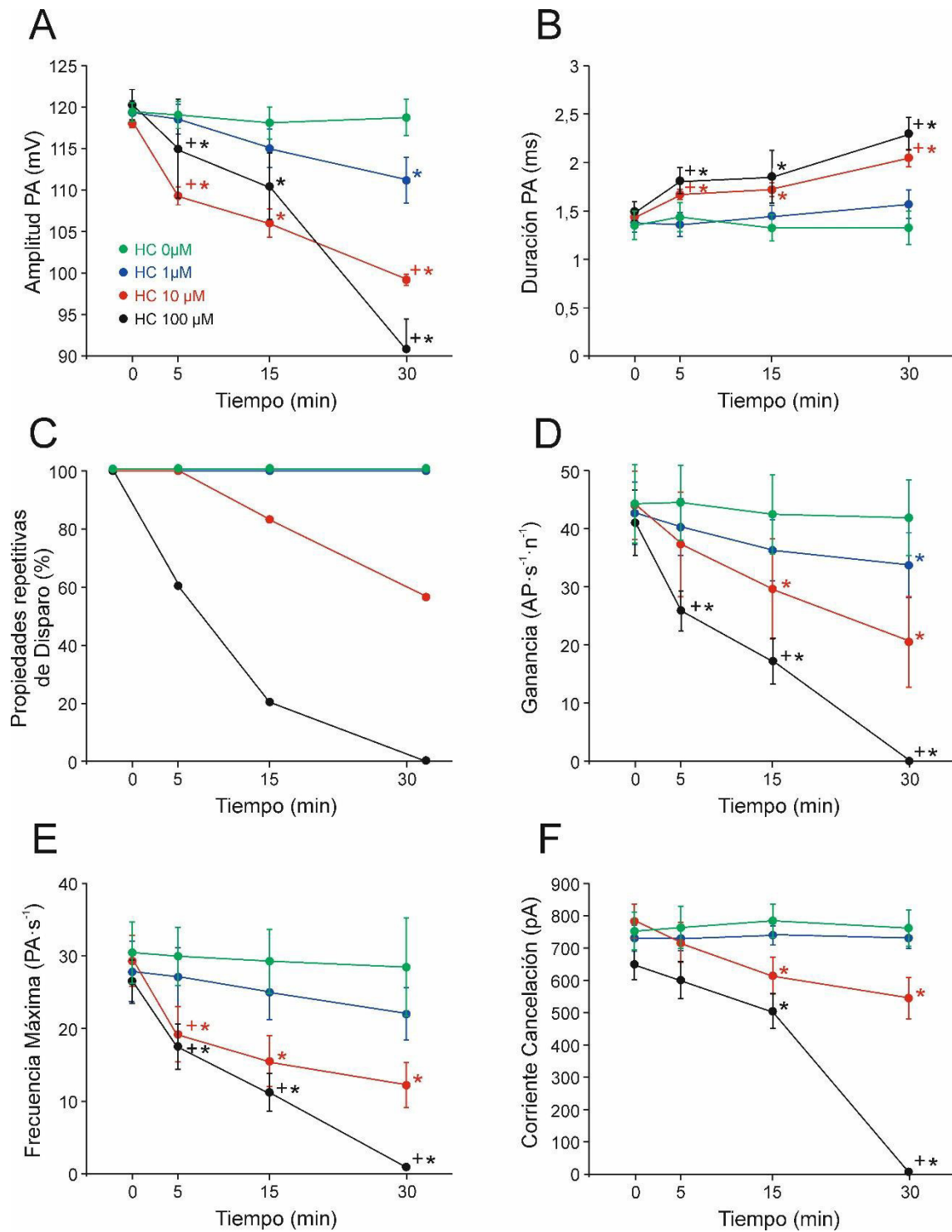


Figura 5.11. Efectos dosis y tiempo dependientes del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre la amplitud del potencial de acción (A), la duración del potencial de acción (B), las propiedades repetitivas de disparo (C), ganancia (D), frecuencia máxima (E) y corriente de cancelación (F) de las neuronas piramidales de la corteza motora. Estos gráficos ilustran los valores medios \pm error estándar a los 0, 5, 15 y 30 minutos en condición control (verde; $n=20$) y tras la exposición a HC 1 μM (azul; $n=30$), 10 μM (rojo; $n=30$) y 100 μM (negro; $n=30$).

5.10. Efectos dosis-dependientes del hidropéroxido de cumeno sobre las propiedades de disparo de las neuronas piramidales de la corteza motora.

Las neuronas piramidales mostraron una descarga fásico-tónica en respuesta a pulsos de corriente despolarizante sostenidos, no solo en situación control, sino también cuando la rodaja se perfundió con HC 1 μM , a cualquier corriente dentro de su rango de disparo (Figura 5.12.A-B). Sin embargo, tras la administración de 10 μM de HC, el 20% de las células al minuto 15 y el 43% al minuto 30 perdieron su capacidad de disparar potenciales de acción de manera repetitiva a cualquier intensidad de corriente. Este efecto fue aún mayor con la concentración de 100 μM de HC afectando al 40% de las neuronas en el minuto 5, al 80% en el minuto 15 y al 100% de la población estudiada tras 30 minutos de perfusión con HC 100 μM (Figura 5.11.C).

En un experimento adicional, se estudió los cambios en las propiedades repetitivas cuando una misma célula era expuesta de forma secuencial a concentraciones crecientes (0, 1, 10 y 100 μM) de HC durante 10 minutos por concentración. La figura 5.12.A-D muestra, en una célula representativa ($n=10$), la respuesta en voltaje a un pulso de corriente despolarizante de 400 pA y larga duración (1 s) durante el experimento arriba mencionado. Así, se puede observar que antes de la perfusión del oxidante (0 μM HC; Figura 5.12.A) y para las concentraciones de 1 (Figura 5.12.B) y 10 μM (Figura 5.12.C) de HC, la neurona ilustrada generó un disparo repetitivo a lo largo de toda la duración del pulso. Sin embargo, como se muestra en la figura 5.12.D, pierde esta capacidad tras ser expuesta durante 10 minutos a 100 μM de HC. En esta figura, podemos observar cómo la célula cesa la descarga antes de la finalización del pulso. Además, la figura 5.12.A-C muestra cómo la frecuencia de disparo disminuye a medida que la concentración de HC aumenta: 23 $\text{PA}\cdot\text{s}^{-1}$ en control, 19 $\text{PA}\cdot\text{s}^{-1}$ en 1 μM de HC, y 12 $\text{PA}\cdot\text{s}^{-1}$ en 10 μM de HC. Estos datos sugieren que el aumento en la dosis de HC altera la ganancia de la descarga de potenciales de acción, y para comprobarlo se calculó este parámetro. Así, la figura 5.12.E representa la relación entre la intensidad de corriente inyectada y la frecuencia de disparo de la célula ilustrada en la figura 5.12.A-D. En esta figura se puede observar cómo esta relación es siempre lineal cuando se aplican corrientes de intensidad baja. Sin embargo, cuando la intensidad aumenta, se aprecian síntomas de acomodación. La figura 5.12.E muestra cómo la neurona comenzó a acomodar a valores de intensidad cercanos a 500 pA para 0 μM HC, 450 pA para 1 μM HC y 400 pA para 10 μM HC. Estos datos indican que el rango de trabajo disminuye a medida que aumenta la concentración del oxidante aplicado. Además, cuando se calculó la ganancia de la neurona mostrada en la figura 5.12.A-D, se observó que este parámetro disminuyó progresivamente de forma concentración dependiente: 53 $\text{PA}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nA}^{-1}$ (0 μM de HC), 46 $\text{PA}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nA}^{-1}$ (1 μM de HC), y 26 $\text{PA}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nA}^{-1}$ (10 μM de HC). El mismo resultado se obtuvo para el conjunto de la población. La figura

5.12.F muestra los valores medios de ganancia en las diferentes situaciones acumuladas (tiempo y concentración del oxidante): $40,1 \pm 5,9 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ (0 μM de HC), $38,3 \pm 4,9 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ (1 μM de HC), $27,7 \pm 8,6 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ (10 μM de HC) y $15,3 \pm 4,1 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{nA}^{-1}$ (100 μM de HC). Este decremento fue estadísticamente significativo para las concentraciones de 10 μM y 100 μM de HC (ver la figura 5.12.F) cuando se comparan con los valores iniciales y entre ellas mismas.

A fin de llevar a cabo un análisis más detallado de los efectos del HC sobre las propiedades repetitivas se analizaron la ganancia, la frecuencia máxima de disparo y la corriente cancelación cuando se expuso de forma independiente una población de 30 neuronas a cada una de las 3 concentraciones usadas en nuestra investigación durante 30 minutos de registro. La ganancia del disparo en situación control, es decir cuando la rodaja se perfundió únicamente con LCRA, se mantuvo estable a lo largo de todo el tiempo de estudio (Figura 5.11.D, color verde). No obstante, tras la perfusión con 1 μM de HC, este parámetro disminuyó progresivamente alcanzando nivel estadístico a los 30 minutos. Esta disminución en la ganancia fue significativa en el minuto 15 para la concentración de 10 μM , y aún antes (minuto 5) cuando se administró 100 μM de HC. Para la concentración de 100 μM , la disminución en la ganancia fue significativa de nuevo a los 15 minutos cuando se comparó con el minuto 5, y en el minuto 30, todas las células perdieron la capacidad de disparar repetitivamente (Figura 5.11.D). En relación a la frecuencia máxima de disparo, ésta también disminuyó de forma progresiva con el tiempo, como se indica en la figura 5.11.E, pero no alcanzó diferencias significativas cuando se administró durante 30 minutos 1 μM de HC. Las diferencias significativas aparecieron en el minuto 5 cuando se administraron las concentraciones de 10 y 100 μM de HC. Así, tras 5 minutos de exposición a 100 μM HC, la frecuencia máxima de disparo disminuyó de $27,2 \pm 3,0 \text{ PA} \cdot \text{s}^{-1}$ a $17,6 \pm 3,2 \text{ AP} \cdot \text{s}^{-1}$. La disminución en la frecuencia máxima fue significativamente más baja de nuevo en el minuto 15 y en el minuto 30, pero solo tras la administración de 100 μM de HC.

Se observaron más evidencias del estrechamiento del rango de trabajo, tras la administración de HC, cuando se analizó la corriente de cancelación (Figura 5.11.F). Esta figura ilustra cómo la cancelación de la descarga repetitiva ocurre a intensidades menores cuando se aplica 10 y 100 μM de HC, pero no se ve afectada en la situación control y con 1 μM HC durante los 30 minutos de registro. En los experimentos en los que se utilizó la concentración de 100 μM , el valor medio de la corriente de cancelación de la población fue de $650,3 \pm 48,4 \text{ pA}$ en las condiciones iniciales. A continuación, los valores de la corriente de cancelación disminuyeron progresivamente hasta $599,3 \pm 56,5 \text{ pA}$ en el minuto 5 y posteriormente a $503,7 \pm 49,9 \text{ pA}$ en el minuto 15, en el cual la bajada ya fue estadísticamente significativa.

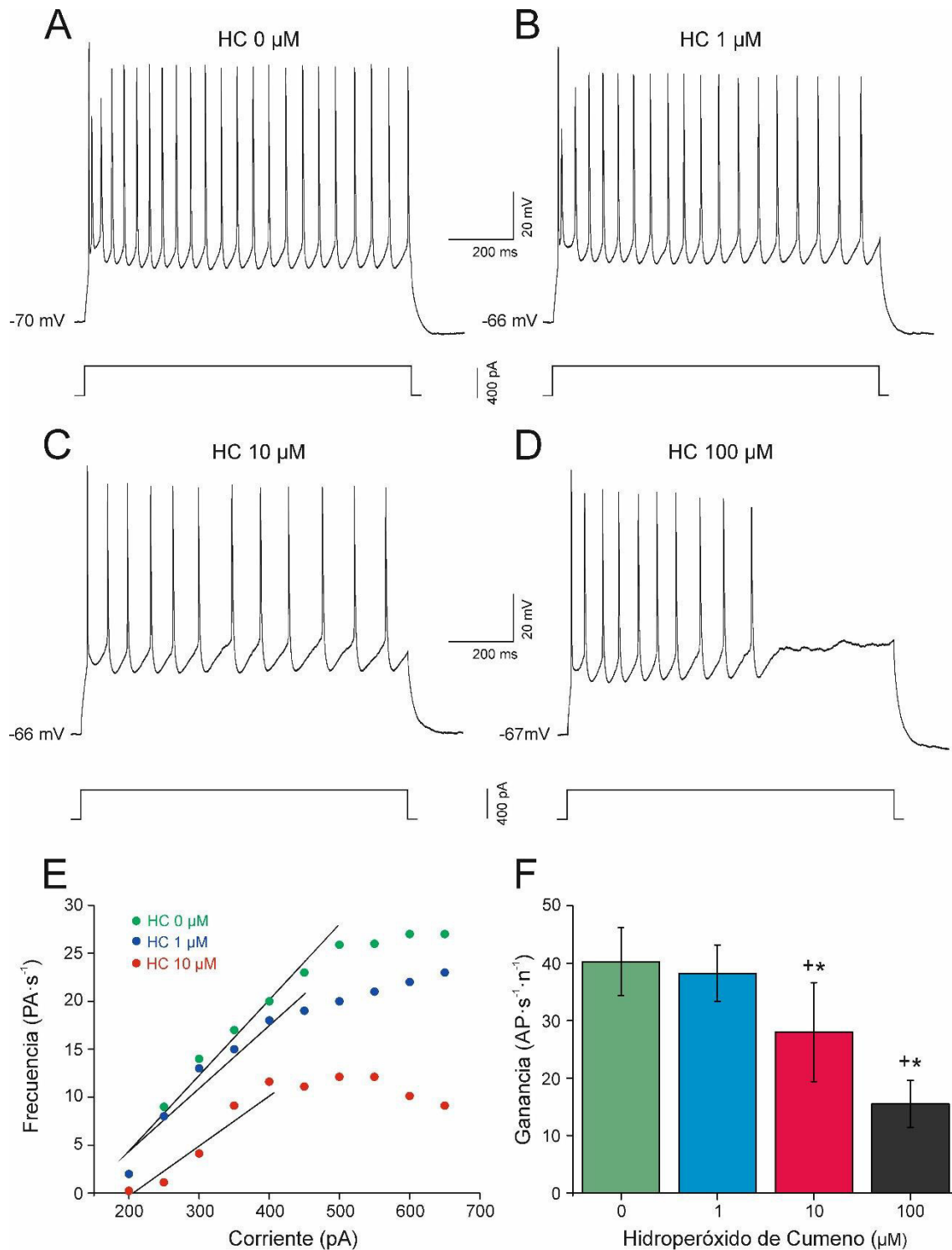


Figura 5.12. Efectos de la aplicación secuencial de dosis cada vez mayores de hidroperóxido de cumeno (HC) sobre las propiedades repetitivas de disparo de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A-D.** Registros que muestran, en la misma célula, las respuestas en voltaje a pulsos de corriente despolarizante de 1 s de duración y 500 pA de intensidad sin la administración de HC (**A**), tras 10 minutos de aplicación de HC 1 μM (**B**), tras 10 minutos más de aplicación de 10 μM de HC (**C**) y tras otros 10 minutos más de administración de HC 100 μM (**D**). **E.** Relación entre la corriente y la frecuencia de disparo para la célula representada en **A-D**. **F.** Histograma que muestra los valores medios de ganancia en situación control y en las otras tres situaciones para la población que mantuvo sus propiedades de disparo durante 30 minutos ($n=6$).

Posteriormente el valor cayó a cero debido a que las neuronas piramidales perdieron por completo la capacidad de disparar de forma repetitiva en el minuto 30. De nuevo las concentraciones de 10 y 100 μM de HC tuvieron efectos que fueron estadísticamente mayores que los obtenidos con 1 μM . Lo mismo ocurre al comparar los efectos (medidos como incrementos) entre 10 y 100 μM de HC con respecto a las propiedades de disparo repetitivo (ganancia, frecuencia máxima y corriente de cancelación) en el minuto 30.

5.11. Naturaleza glutamatérgica y GABAérgica de las entradas sinápticas de las neuronas piramidales de la corteza motora.

Una vez demostrado que la LPO producida por el HC modificaba las propiedades electrofisiológicas de las neuronas de la corteza motora, nos preguntamos si estos cambios podrían ser producidos por alteraciones a nivel sináptico, o si por el contrario se debían únicamente a un efecto directo sobre las propiedades intrínsecas de la neurona piramidal. Con este fin, se realizaron experimentos de fijación de voltaje para estudiar el efecto de la LPO sobre la actividad sináptica excitadora e inhibidora que reciben las células piramidales de la capa V de la corteza motora. En estos experimentos, y teniendo en cuenta la composición de nuestros líquidos extracelulares e intracelulares, cuando se fijaba el potencial de membrana en -70 mV todas las corrientes de entrada o “inward currents” registradas eran excitadoras y cuando se fijaba el potencial de membrana a 0 mV todas las corrientes de salida o “outward currents” eran inhibitoras. Además, se pudo comprobar que todas las corrientes excitadoras eran de carácter glutamatérgico pues se abolieron cuando las rodajas se perfundieron con CNQX (50 μM) y APV (25 μM), antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (Figura 5.13.A). Así mismo, también se demostró que las corrientes inhibitoras eran de naturaleza GABAérgica pues desaparecieron tras la perfusión con gabazina (20 μM), un antagonista de los receptores GABA_A (Figura 5.13.B)

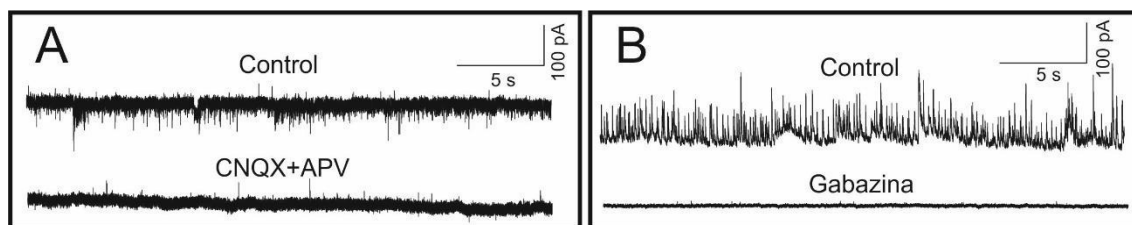


Figura 5.13. Efectos de CNQX, APV y gabazina sobre las corrientes postsinápticas espontáneas de las neuronas piramidales de la corteza motora. A. Efecto del CNQX (50 μM) y APV (25 μM) sobre las corrientes postsinápticas espontáneas excitadoras (sEPSC). Para realizar estos registros se fijó el voltaje a -70 mV. B. Efecto de la gabazina (10 μM) sobre las corrientes postsinápticas espontáneas inhibitoras (sIPSC). Para realizar estos registros se fijó el voltaje en 0 mV. Nótese que las entradas sinápticas excitadoras e inhibitoras son glutamatérgicas y GABAérgicas respectivamente.

5.12. Efecto de la aplicación de HC sobre las entradas sinápticas excitadoras de las neuronas piramidales de la corteza motora.

En primer lugar, se realizaron registros en configuración de fijación de voltaje, con electrodos rellenos con metanosulfonato de cesio, a un potencial de membrana fijado en -70 mV. En estos experimentos investigamos si las entradas sinápticas espontáneas glutamatérgicas se modifican por la LPO inducida por la aplicación de 10 μ M de HC. La figura 5.14.A ilustra los registros de las corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas (sEPSC) de una neurona piramidal en condiciones control y tras 5, 15 y 30 minutos de aplicación de HC. Estos registros muestran un descenso en la frecuencia de potenciales sinápticos excitadores espontáneos tras la administración de HC. Para toda la población ($n=20$), la frecuencia media de sEPSC (Figura 5.14.C) permaneció inalterada a los 5 minutos de perfusión del oxidante, pero descendió significativamente un 33% desde la situación control ($1,59 \pm 0,11$ Hz) tras 15 minutos ($1,23 \pm 0,13$ Hz) de aplicación de HC. Además, los sEPSC individuales que se registraron mostraron amplitudes más pequeñas, más evidente en la figura 5.14.A a los 15 y 30 minutos de la aplicación del HC. La figura 5.14.B, que ilustra unos registros promediados (ver materiales y métodos) de sEPSC, muestra con más precisión los cambios en la amplitud y en la forma de los eventos ilustrados en la figura 5.14.A. En esta figura se observa una disminución progresiva de la amplitud que ya es estadísticamente significativa a los 15 minutos. Así, la amplitud de los eventos disminuyó de $-37,8 \pm 2,3$ pA en condiciones control hasta $-26,6 \pm 1,6$ pA tras 15 minutos de administración de HC (Figura 5.14.D).

Las figuras 5.14.F y 5.14.G representan gráficos de probabilidad de amplitud de los eventos de la misma neurona ilustrada en 5.14.A-B. La figura 5.14.F muestra que el mayor número de sEPSC se encuentran en la región alrededor de -30 pA en condiciones control, y en la región de -15 y -20 pA a los 15 y 30 minutos de la aplicación de HC. Esta figura muestra también que los eventos mayores de 40 pA desaparecen a los 15 y 30 minutos de la administración del HC. En la figura 5.14.G se puede observar cómo el HC provoca una desviación hacia la izquierda en la probabilidad de amplitud de los sEPSC cuando los datos se representan en diagramas normalizados acumulados, que fue más evidente a los 15 minutos, sin afectarse el umbral de corriente. Por otra parte, la amplitud A_{50} (valor alcanzado por el 50% de las corrientes postsinápticas) fue de 27,8 pA en condiciones control, disminuyó hasta los 23,6 pA a los 5 minutos, y volvió a disminuir de nuevo hasta los 17,0 y los 16,1 pA a los 15 y 30 minutos de la aplicación de HC, respectivamente. En paralelo con el descenso en frecuencia y amplitud, la constante de tiempo de bajada de los sEPSC (Figura 5.14.E) también disminuyó significativamente desde $4,86 \pm 0,79$ en situación control hasta $3,37 \pm 0,40$ a los 15 minutos de la aplicación del HC.

Finalmente, hay que mencionar que un lavado prolongado durante 30 minutos no revirtió los efectos observados en frecuencia, amplitud y constante de bajada de los sEPSC (no mostrados en las figuras, $n=5$).

Para profundizar en el mecanismo por el que la LPO induce daño neuronal se administró TTX ($1\mu\text{M}$) para observar la liberación independiente de potencial de acción (Figura 5.15.A) y estudiar lo que se conoce con el nombre de corrientes postsinápticas en miniatura o minis. Esta figura y la figura 5.15.C, muestran que la frecuencia de eventos de corrientes excitadoras postsinápticas en miniatura (mEPSC) no varía con la administración de HC. La forma típica de los mEPSC se ilustra en la figura 5.15.B. No se observaron diferencias en la amplitud (Figura 5.15.D), pendiente de subida (10-90%; Figura 5.15.E) o en la constante de tiempo de bajada de los mEPSC (Figura 5.15.F) tras 15 minutos de aplicación del HC en la población de neuronas registradas ($n=10$). Tampoco se encontraron cambios en la distribución de los mEPSC mostrados en la figura 5.15.G o en los diagramas acumulados normalizados ilustrados en la figura 5.15.H tras la aplicación de HC. La amplitud A50 también permaneció inalterada tras la aplicación de HC: 14,4 pA en ausencia de HC y 13,5 pA tras su administración. De hecho, los valores de frecuencia, amplitud y constante de bajada de los mEPSC obtenidos en presencia de TTX (Figura 5.15.C, D y F) son similares a los valores obtenidos para los sEPSC tras 30 minutos de aplicación de HC (Figura 5.14.C-E). Como el tamaño y la duración de los sEPSC están determinados por la cantidad de glutamato liberado, al reducir la liberación de glutamato se acelera la constante de tiempo de bajada de los EPSC (Takahashi y col., 1995).

Nuestros datos sugieren que la caída en la concentración de glutamato en el espacio sináptico puede explicar la disminución de la constante de tiempo de bajada de los EPSC. De estos datos podemos concluir que los efectos del HC en la liberación sináptica pueden ser explicados por el bloqueo del componente de los sEPSC que está mediado por potencial de acción, sin afectarse el mecanismo que gobierna la fusión de las vesículas con la membrana, la recaptación de glutamato y las propiedades de los receptores glutamatérgicos postsinápticos.

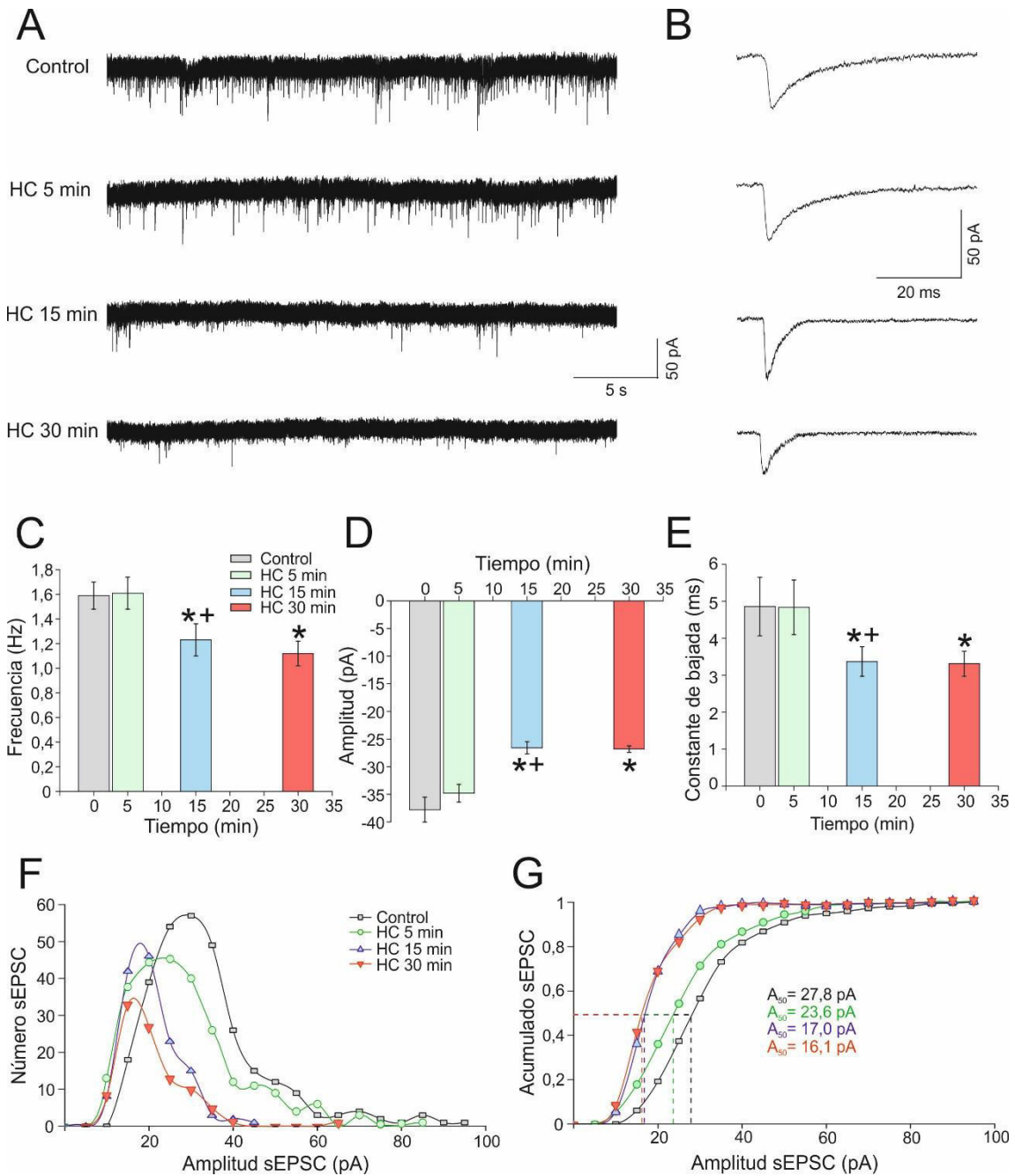


Figura 5.14. Efectos del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre las corrientes postsinápticas espontáneas excitadoras (sEPSC) de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Registro de sEPSC en condiciones control y a 5, 15 y 30 minutos tras la administración de HC (10 μ M). **B.** Registros que muestran sEPSC promediados en condiciones control y tras la administración del oxidante. **C-E.** Histogramas que muestran los valores medios ($n=20$) de frecuencia, amplitud y constante de bajada en condiciones control y tras la administración de HC. **F.** Gráfico que muestra la relación entre el número de sEPSC y la amplitud para las cuatro condiciones. Nótese que el HC induce un descenso en la frecuencia de sEPSC y un acortamiento de la duración de dichos sEPSC, como consecuencia del descenso en la constante de bajada tras 15 minutos de aplicación de HC. **G.** Gráfico normalizado del acumulado de sEPSC respecto a la amplitud. Las líneas punteadas muestran los valores de amplitud (A_{50}) alcanzados por el 50% de los sEPSC en cada situación experimental.

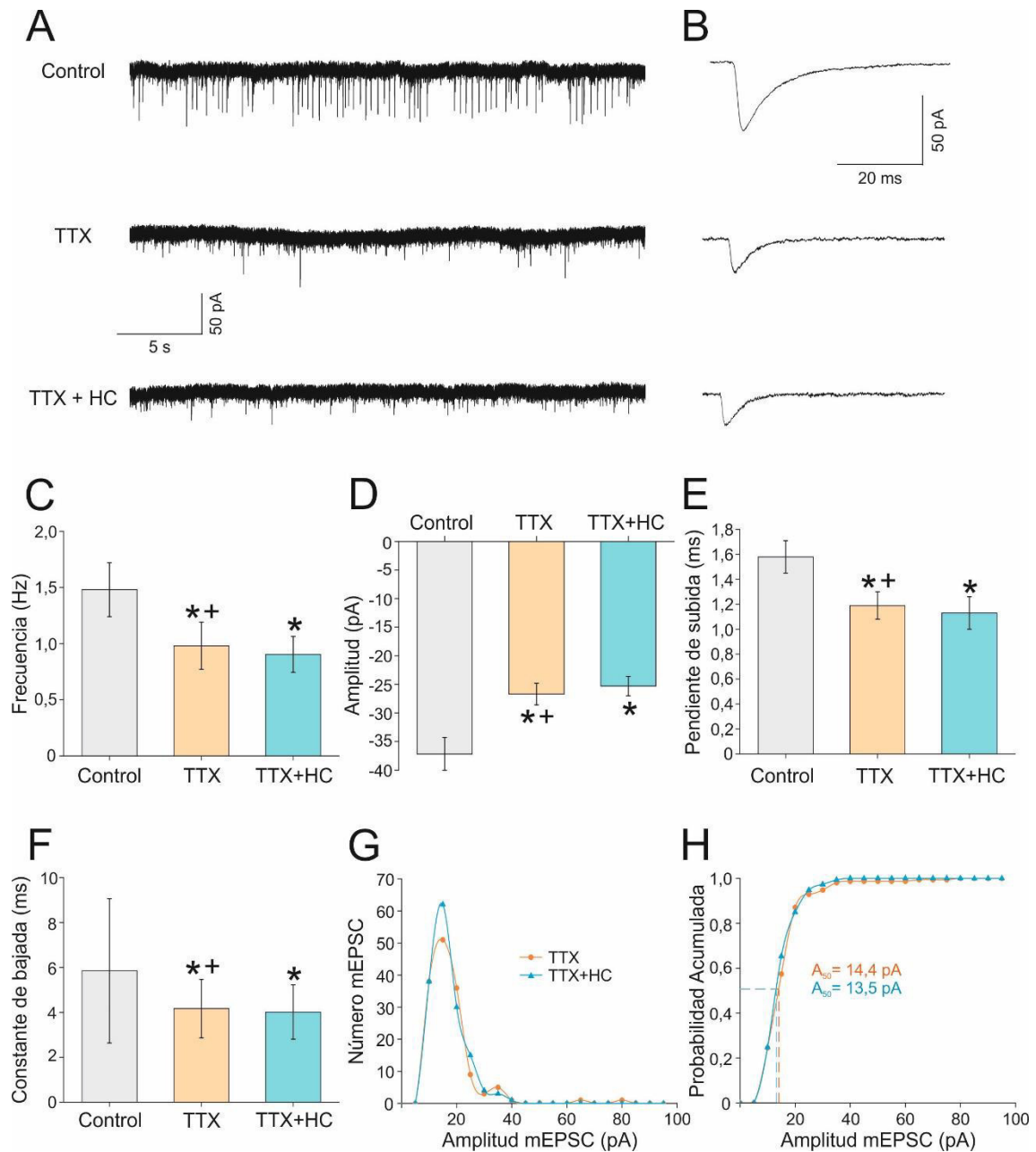


Figura 5.15. Efectos del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura (mEPSC) de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Registros que muestran corrientes postsinápticas excitadoras (EPSC) en condiciones control (EPSC espontáneos; sEPSC) (arriba), tras la administración de tetrodotoxina (TTX; 1 μ M) (mEPSC; en medio) y el efecto de la aplicación de HC 10 μ M durante 15 minutos sobre los mEPSC (abajo). **B.** Registros que muestran EPSC promedios en las tres situaciones ilustradas en A. **C-F.** Histogramas que muestran los valores medios ($n=10$) de frecuencia, amplitud, pendiente de subida (90-10 %) y constante de bajada para todas las situaciones experimentales. **G.** Gráfico que muestra la relación entre el número de mEPSC en situación control y tras la aplicación de HC. **H.** Gráfico normalizado del acumulado de mEPSC en relación con la amplitud, en situación control y tras la aplicación de HC. Las líneas punteadas muestran los valores de amplitud (A_{50}) alcanzados por el 50% de los mEPSC en ambas situaciones.

5.13. Efecto de la aplicación de HC sobre las entradas sinápticas inhibitoras en las neuronas piramidales de la corteza motora.

La depresión sináptica mediada por HC en la neurotransmisión glutamatérgica excitadora podría extenderse a la liberación de transmisores inhibidores. Por tanto, para evaluar si las entradas sinápticas espontáneas GABAérgicas también se modifican por la LPO se realizaron registros de fijación de voltaje a 0 mV.

La figura 5.16.A ilustra registros de corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas (sIPSC) de una neurona piramidal en las condiciones control y tras 5, 15 y 30 minutos de aplicación de HC. En estos registros se observa una bajada en la frecuencia de eventos sinápticos espontáneos tras 5 minutos de la aplicación de HC. La frecuencia media de los sIPSC (Figura 5.16.C) disminuye significativamente un 27% respecto al control ($6,96 \pm 0,5$ Hz) a los 5 minutos de la aplicación de HC ($5,1 \pm 0,34$ Hz). En la figura 5.16.B se ilustran los registros promedio de sIPSC. Estos registros muestran una disminución progresiva de la amplitud que ya es estadísticamente significativo respecto del control a los 5 minutos de la aplicación del HC. Tras 15 minutos de tratamiento, el HC produce de nuevo un descenso significativo en la amplitud de los eventos; sin embargo, no se observan diferencias entre los 15 y los 30 minutos de tratamiento. Así, para toda la población ($n=20$), el valor de amplitud de los eventos descendió desde $113,6 \pm 11,5$ pA en condiciones control hasta $75,1 \pm 5,7$ pA a los 5 minutos de exposición al HC, y de nuevo disminuyó hasta $51,5 \pm 3,4$ (Figura 5.16.D) a los 15 minutos de la inducción de la LPO. La figura 5.16.F muestra el gráfico de probabilidad de la amplitud de los eventos sinápticos para el ejemplo representado en la figura 5.16.A. Esta figura indica que la mayoría de los sIPSC tienen amplitudes alrededor de los 35 pA en condición control, y cercanos a 20 pA a los 15 y 30 minutos tras la aplicación del HC. En esta figura también se puede observar que los eventos mayores de 75 pA desaparecen casi por completo a los 5 minutos de la aplicación del HC, mientras que en la situación control aparece un gran número de eventos con amplitudes comprendidas entre 75 y 250 pA. La figura 5.16.G muestra que el HC provoca un desplazamiento hacia la izquierda en la probabilidad de amplitud de los eventos sIPSC cuando los datos se representan en un diagrama acumulativo normalizado, que ya fue evidente a los 5 minutos de tratamiento. Por otra parte, la amplitud A50 de los sIPSC (valor alcanzado por el 50% de las corrientes postsinápticas) es de 107,6 pA en la situación control, disminuye hasta 39,2 pA a los 5 minutos, y disminuye de nuevo hasta 28,7 y 23,4 pA a los 15 y 30 minutos de la aplicación del HC, respectivamente.

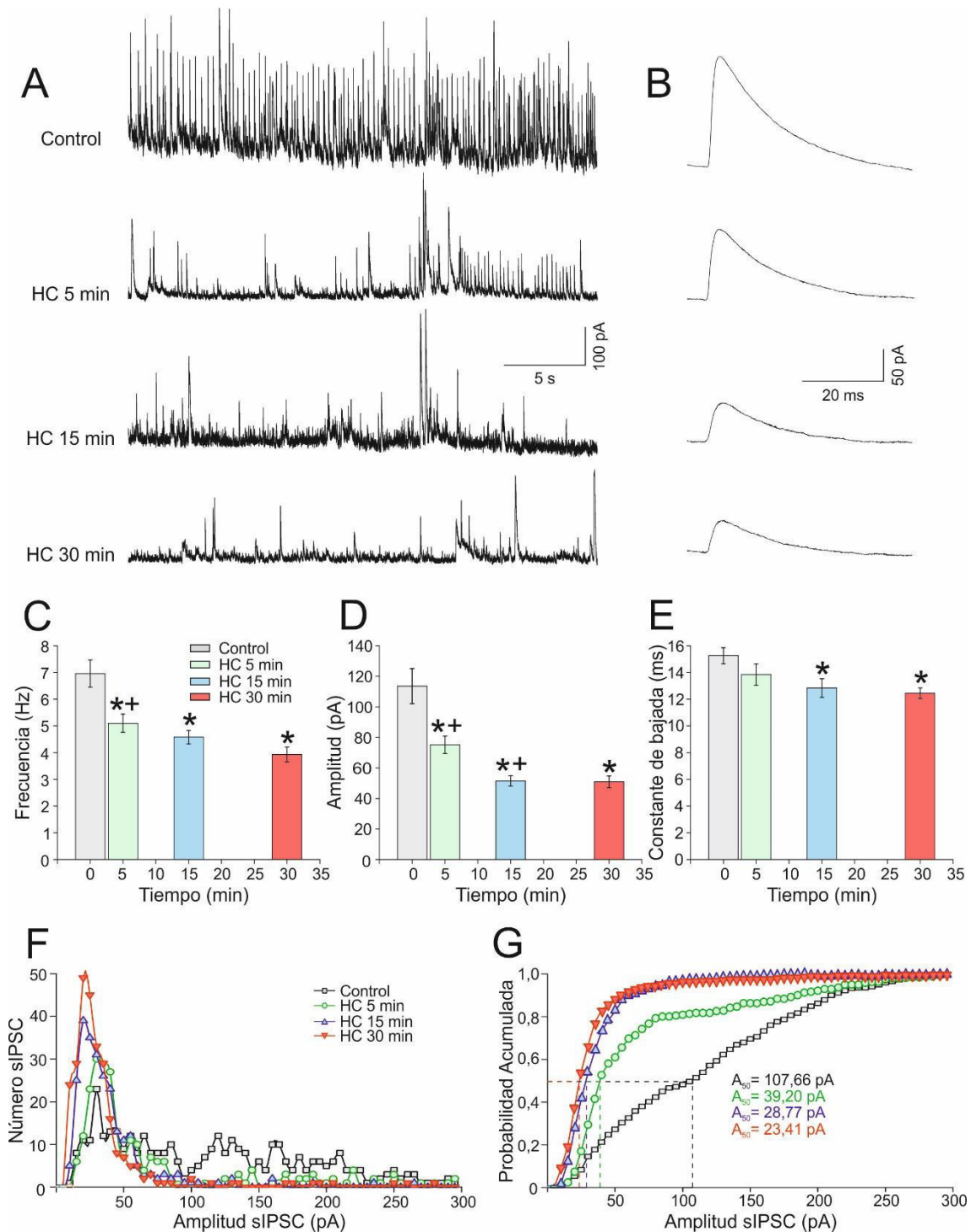


Figura 5.16. Efectos del hidroperóxido de cumeno (HC) sobre las corrientes postsinápticas espontáneas inhibitoras (sIPSC) de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Registro de sIPSC en la situación control y tras 5, 15 y 30 minutos de la aplicación de HC (10 μ M). **B.** Registros que muestran sIPSC promediados en condiciones control y tras la administración del oxidante. **C-E.** Histogramas que muestran los valores medios ($n=20$) de frecuencia, amplitud y constante de bajada en situación control y tras la administración de HC. **F.** Gráfico que ilustra la relación entre el número de sIPSC y la amplitud para las cuatro condiciones estudiadas. Nótese que el HC induce un descenso en la frecuencia y en la constante de bajada de los sIPSC, ya evidente tras 5 minutos de aplicación de HC. **G.** Gráfico normalizado del acumulado de sIPSC respecto a la amplitud. Las líneas punteadas muestran los valores de amplitud (A_{50}) alcanzados por en 50% de los sIPSC en cada situación experimental.

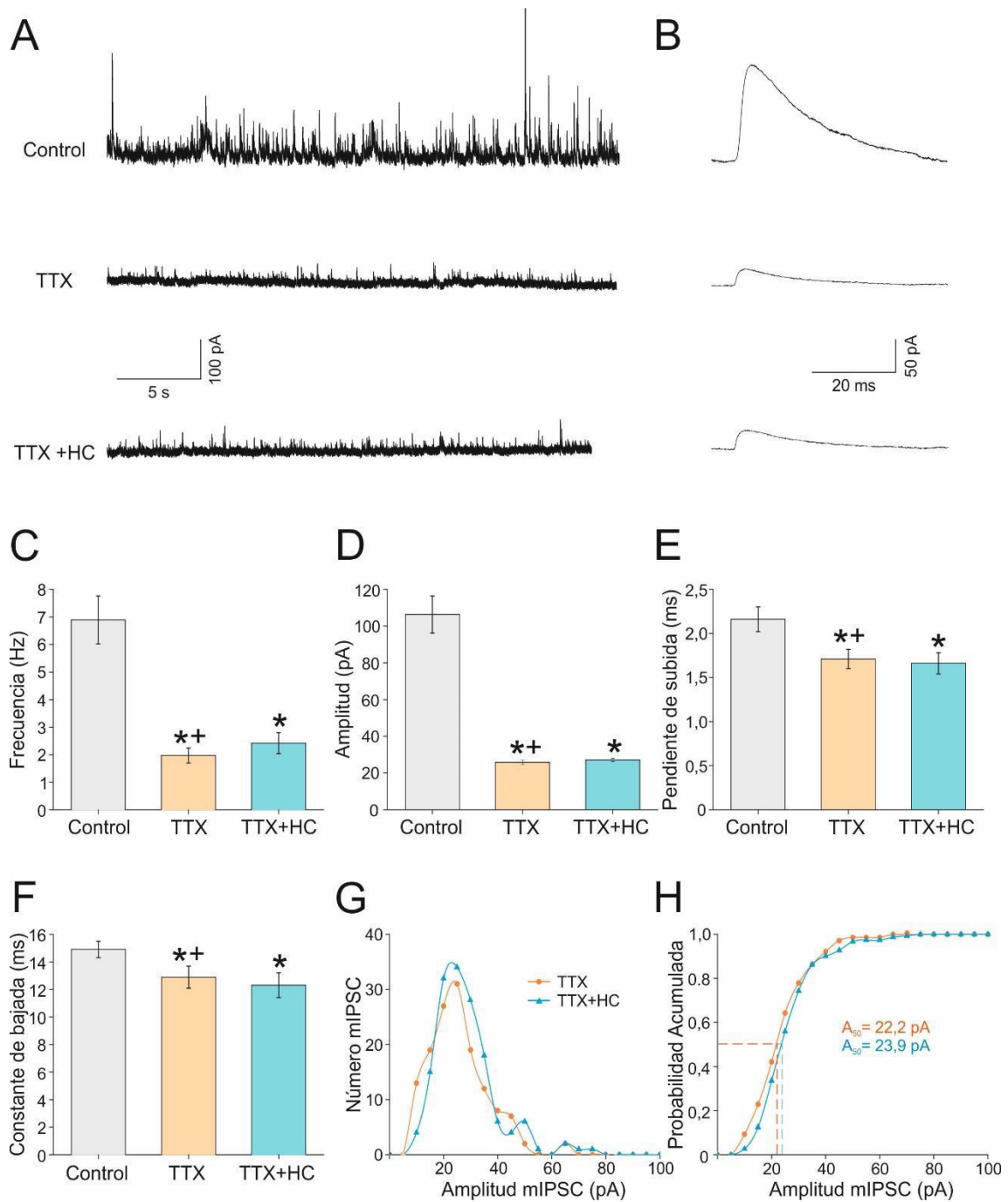


Figura 5.17. Efectos del hidropéroxido de cumeno (HC) sobre las corrientes postsinápticas inhibitoras en miniatura (mIPSC) de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Registro que muestra las corrientes postsinápticas inhibitoras (IPSC) en situación control (IPSC espontáneos; sIPSC) (arriba), tras la administración de tetrodotoxina (TTX; 1 μ M) (mIPSC; en medio) y los efectos sobre los mIPSC tras la aplicación de HC 10 μ M durante 15 minutos (abajo). **B.** Registros que muestran IPSC promediados en las tres situaciones ilustradas en A. **C-F.** Histogramas que muestran los valores medios ($n=10$) de frecuencia, amplitud, pendiente de subida (90-10 %) y constante de bajada para todas las situaciones experimentales. **G.** Gráfico que muestra la relación entre el número de mIPSC en situación control y tras la aplicación de HC. **H.** Gráfico normalizado del acumulado de mIPSC en relación con la amplitud en situación control y tras la aplicación de HC. Las líneas punteadas muestran los valores de amplitud (A_{50}) alcanzados por el 50% de los mEPSC en ambas situaciones.

A continuación, se registraron en presencia de TTX las corrientes postsinápticas inhibitoras en minituras (mIPSC, $n=10$, Figura 5.17.A). En estos registros y en la figura 5.17.C se puede ver que no hay cambios en la frecuencia de mIPSC tras la aplicación de HC. La figura 5.17.B ilustra la forma típica de los mIPSC promediados del ejemplo representado en la figura 5.17.A y muestra que durante 15 minutos de aplicación de HC no se produce ningún cambio en la forma del evento sináptico, amplitud (Figura 5.17.D), pendiente de subida del evento (10-90%; Figura 5.17.E) o constante de tiempo de bajada del evento (Figura 5.17.F).

Tampoco se encontraron diferencias en la distribución de los mIPSC tras la aplicación de HC, como se observa en la figura 5.17.G o en el diagrama acumulado normalizado mostrado en la figura 5.17.H. La amplitud A_{50} permaneció inalterada en un valor de 22-23 pA. Estos resultados sugieren que los mIPSC no se ven afectados por HC como se observó anteriormente en los mEPSC. Por otra parte, la frecuencia de mIPSC es significativamente más baja a la obtenida en sIPSC tras 30 minutos de aplicación de HC. El TTX reduce la frecuencia de los IPSC hasta $1,97 \pm 0,27$ Hz, mientras que la frecuencia de los IPSC tras 30 minutos de tratamiento con HC es $3,93 \pm 0,28$ Hz. Además, los valores de amplitud de los mIPSC obtenidos en presencia de TTX ($27,1 \pm 0,8$ pA; Figura 5.17.D) son menores que los obtenidos en los sIPSC tras 30 minutos de aplicación de HC ($50,9 \pm 3,8$; Figura 5.16.D). Concluimos de estos datos que la transmisión sináptica inhibitora se interrumpe tras 5 minutos de exposición al HC, pero no es completamente abolida tras 30 minutos de tratamiento.

5.14. Contribución del bloqueo de entradas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas en el efecto del HC sobre la excitabilidad neuronal.

Las modificaciones sinápticas producidas por el HC, descritas anteriormente, podrían tener una acción directa sobre la excitabilidad neuronal. Los registros en fijación de corriente mostraron, como ya hemos visto, una despolarización progresiva en las neuronas piramidales. Previamente hemos demostrado, además, que el HC produce un cambio bifásico en la resistencia de membrana con un aumento transitorio alrededor del minuto 5 tras la aplicación del oxidante, tras lo cual disminuye gradualmente hasta valores inferiores a los controles. La coincidencia temporal de la despolarización del potencial de membrana y del aumento en la resistencia con el bloqueo de las entradas sinápticas inhibitoras nos llevó a plantearnos si estos hechos estaban relacionados. En primer lugar, exploramos aplicando TTX el efecto del bloqueo de la transmisión sináptica premotora, dependiente de potencial de acción, sobre la resistencia de membrana. La figura 5.18.A representa un registro continuo de fijación de corriente en el que se aplica de forma sistemática, cada minuto, un pulso de corriente hiperpolarizante de -100 pA de intensidad y 200

TTX	CONTROL	TTX	HC (5 min)	HC (15 min)
Potencial de Membrana (mV)	-70,3 ± 0,86	-70,7 ± 0,99	-68,2 ± 1,35 *+	-67,0 ± 1,46 *+
Resistencia (MΩ)	142,0 ± 6,3	152,6 ± 5,3 *+	157,8 ± 7,1 *+	121,8 ± 6,8 *+
Línea Base (pA)		-10,0 ± 4,4 *+	-17,9 ± 6,4 *+	-42,5 ± 13,8 *+

Tabla 5.2. Efectos del TTX sobre el potencial de membrana, la resistencia y la corriente de entrada.

ms de duración, para observar la respuesta en voltaje. Esta figura muestra que tras 5 minutos de aplicación de TTX se produce un aumento en la amplitud de las respuestas en voltaje, lo que significa un aumento en la resistencia de membrana. Específicamente, en esta célula la resistencia aumenta desde un valor control de 146 MΩ hasta 162 MΩ. Para la población completa (n=12), la resistencia fue 142±6,3 MΩ en situación control y ésta aumentó significativamente hasta 152,6±5,3 MΩ en presencia de TTX (Tabla 5.2). Además, como se observa en la figura 5.18.A, tras 5 minutos de aplicación de HC la respuesta en voltaje se mantiene inalterada y no se observa un efecto adicional en la resistencia (Tabla 5.2). Después, como se muestra en la figura 5.18.A y en la tabla 5.2, los valores de resistencia disminuyen progresivamente alcanzando a los 15 minutos valores por debajo de los iniciales (129 MΩ en el ejemplo de la figura). En cuanto al potencial de membrana, no se encontró ningún efecto del TTX sobre el mismo, pero sí se observó una pequeña despolarización del potencial de membrana de alrededor de 3 mV tras la aplicación del HC (Figura 5.18.A; Tabla 5.2). De estos datos se puede deducir que el incremento en la resistencia de membrana típicamente observado durante los primeros minutos de la aplicación del HC podría ser consecuencia de la depresión sináptica producida por el TTX.

La figura 5.18.B representa un registro de fijación de voltaje a -70 mV tras la perfusión de la rodaja con TTX y posteriormente con TTX y HC. En la figura puede observarse una pequeña corriente de entrada producida por la administración de TTX. Para toda la población celular registrada (n=12) la corriente de entrada observable tras la aplicación de TTX alcanzó un valor de -10,0±4,4 pA (Tabla 5.2). A continuación, la administración de HC provocó un lento y significativo aumento en la corriente de entrada que para el conjunto de la población registrada alcanzó un valor de -17,9±6,4 pA a los 5 minutos y de -42,5±13,8 pA a los 15 minutos de aplicación de HC (Tabla 5.2; -44 pA para la neurona ilustrada en la figura 5.18.B). Estos datos sugieren que el HC provoca una corriente despolarizante a través de un mecanismo que es, al menos en parte, insensible a TTX (y por tanto no está mediado sinápticamente), y que no es bloqueado por el Cs⁺ intracelular incluido en el microelectrodo de patch. Por tanto, concluimos que esta corriente puede ser la causa de la despolarización que observamos en las neuronas piramidales tras la exposición a HC.

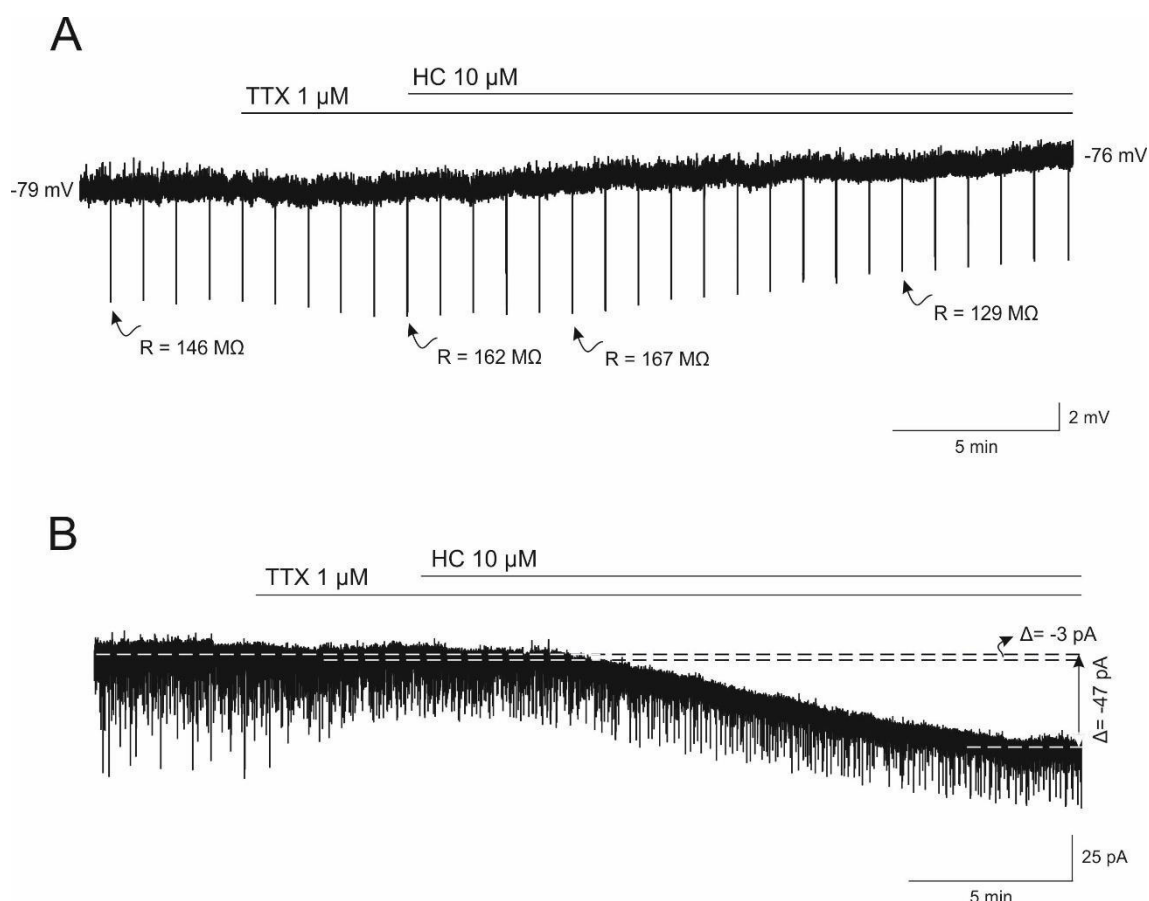


Figura 5.18. Efectos de la tetrodotoxina (TTX) y el hidroperóxido de cumeno (HC) sobre la resistencia (R), el potencial de membrana y la corriente de fijación de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A.** Respuesta en voltaje a pulsos de corriente negativa (-100 pA) en situación control (primera flecha desde la izquierda), tras 5 minutos de administración de TTX 1 μ M (segunda flecha) y tras el tratamiento con HC (5 minutos, tercera flecha; 15 minutos, cuarta flecha). Nótese el incremento en amplitud de la respuesta en voltaje tras la aplicación de TTX (incremento en resistencia) que permanece inalterado tras los primeros 5 minutos de aplicación de HC. A continuación la respuesta en voltaje disminuye progresivamente tras registrar durante 15 minutos más. También se observa una despolarización del potencial de membrana. **B.** Registro en fijación de voltaje que muestra los cambios que se producen en la corriente para fijar el voltaje a -70 mV tras la administración de TTX y HC. Nótese que la administración de TTX y HC causa una corriente de entrada (despolarizante) de -3 pA y -44 pA, respectivamente.

Posteriormente, se examinó la contribución de las entradas sinápticas glutamatérgicas y GABAérgicas a los efectos observados del TTX y del HC sobre las propiedades de membrana. Para ello se llevaron a cabo experimentos con antagonistas de neurotransmisores. El bloqueo de la transmisión fásica excitadora con CNQX y APV no previno los efectos del HC sobre la despolarización de la membrana y el cambio bifásico observado en la resistencia de membrana (ver Tabla 5.3).

	CNQX + APV	CONTROL	CNQX + APV	HC (5 min)	HC (15min)
Potencial de Membrana (mV)		-74,5 ± 1,5	-72,9 ± 1,6	-69,9 ± 2,1 *+	-67,0 ± 2,3 *+
Resistencia (MΩ)		142,7 ± 12,3	145,0 ± 11,6	160,7 ± 11,4 *+	127,5 ± 11,5 *+

Tabla 5.3. Efectos de la adición de CNQX y APV sobre el potencial de membrana y la resistencia de las células piramidales de la corteza motora.

El bloqueo de la transmisión sináptica inhibitoria con gabazina (bloqueador de GABA_A), sin embargo, sí eliminó los efectos del HC que producen el incremento transitorio de la resistencia de membrana alrededor del minuto 5 de exposición al oxidante. La figura 5.19.A-D ilustra los registros de una célula representativa mostrando las respuestas del potencial de membrana a pulsos cuadrados de corriente positiva y negativa de 50 pA en condición control, tras la adición de gabazina y tras la aplicación de una mezcla de gabazina y HC. Como se ve en la figura 5.19.E, la resistencia de membrana de esta neurona se incrementó de 181 a 208 MΩ tras el bloqueo de los receptores GABAérgicos con gabazina. Por otro lado, la resistencia de membrana permaneció invariable en un valor de 205 MΩ tras 5 minutos de aplicación de HC, y seguidamente disminuyó a 119 MΩ a los 15 minutos (Figura 5.19.F). Resultados similares se encontraron en todas las células registradas (n=12; Tabla 5.4).

	Gabazina	CONTROL	Gabazina	HC (5min)	HC (15 min)
Potencial de Membrana (mV)		-75,8 ± 1,9	-74,8 ± 1,5	-70,6 ± 2,2 *+	-69,7 ± 2,4 *
Resistencia (MΩ)		153,0 ± 11,6	171,2 ± 9,7 *+	176,6 ± 8,8 *	124,8 ± 3,7 *+

Tabla 5.4. Efectos de la adición de gabazina sobre el potencial de membrana y la resistencia de las células piramidales de la corteza motora.

Una consecuencia funcional del incremento en resistencia en presencia de gabazina y a los 5 minutos de exposición al HC es que la célula piramidal de la figura 5.19 A-D muestra un descenso en la reobase, comparado con la condición control. En esta célula, una corriente de 100 pA consiguió generar un potencial de acción cuando se trató con gabazina y tras 5 minutos de aplicación de gabazina más HC, pero no en la situación control. De estos datos, concluimos que bloquear las entradas GABAérgicas con gabazina produce unos resultados similares a los observados cuando se aplicó el TTX, o cuando se aplica HC durante 5 minutos. Estos resultados nos hicieron pensar que el aumento transitorio en la resistencia de membrana a los 5 minutos de la aplicación de HC se podría deber a la afectación por este oxidante de una corriente inhibitoria tónica mediada por los receptores GABA.

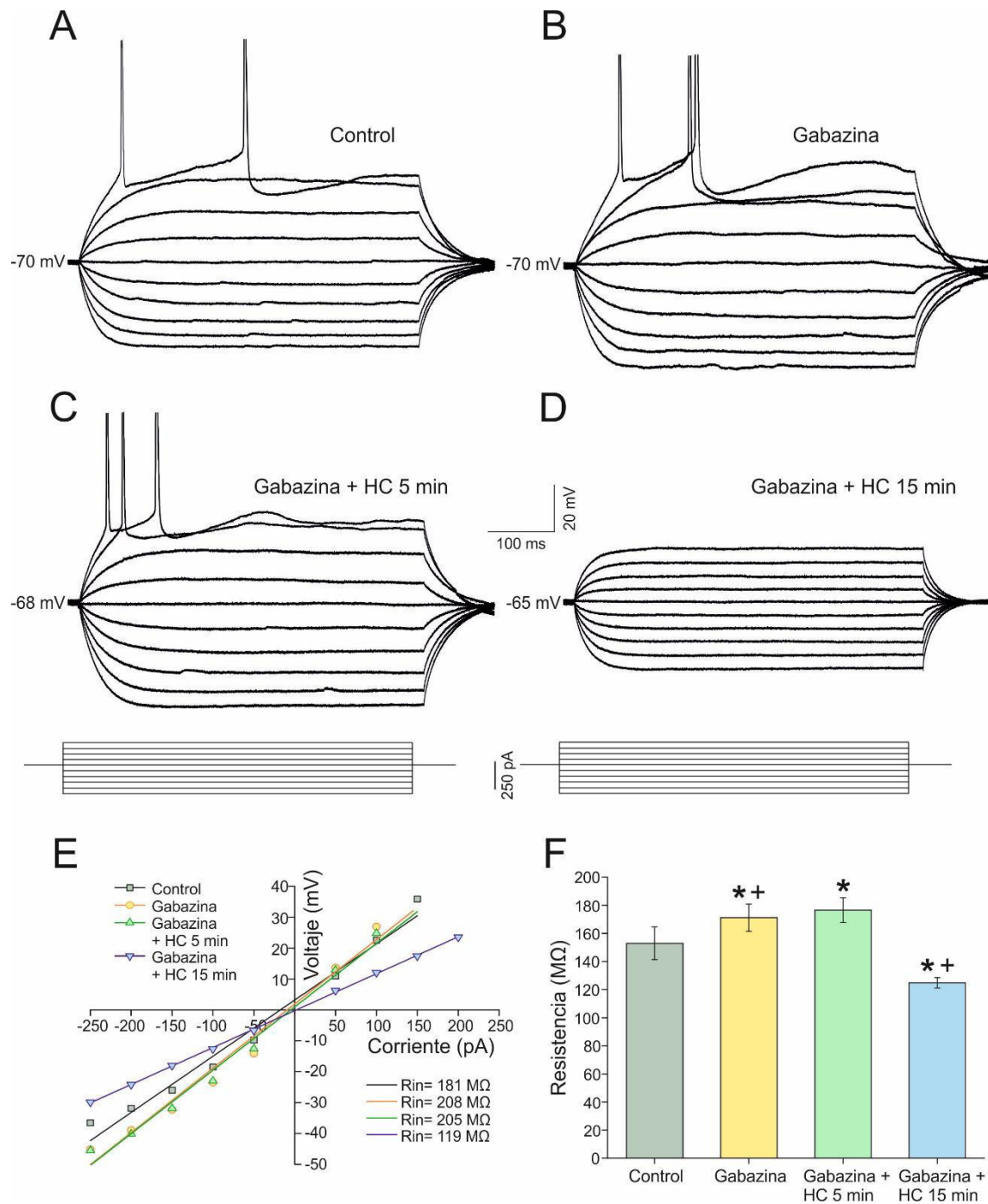
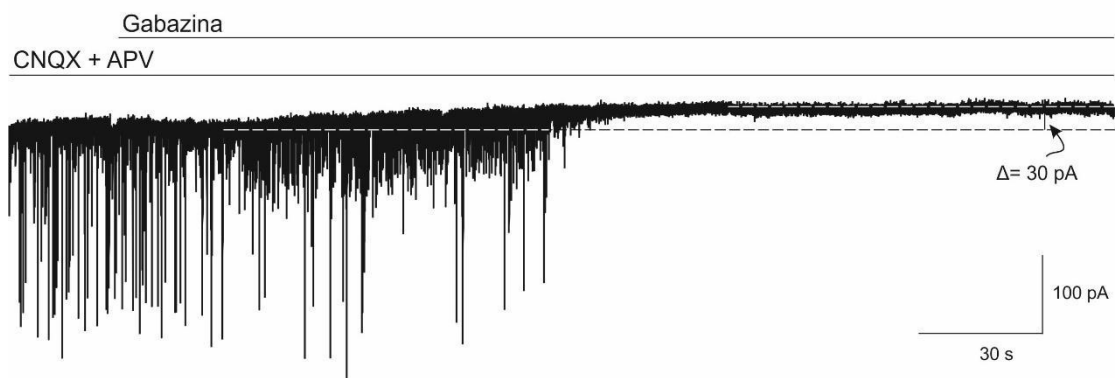


Figura 5.19. Efectos de la gabazina y el hidroperóxido de cumeno (HC) sobre la resistencia de entrada de las neuronas piramidales de la corteza motora. **A-D.** Registros de la misma célula que muestran las respuestas del potencial de membrana a pulsos cuadrados de corriente positiva y negativa de 50 pA en situación control (**A**), tras la adición de gabazina (10 μ M) (**B**) y a 5 y 15 minutos de la aplicación de gabazina con HC 10 μ M (**C** y **D**). El pico de los potenciales de acción se ha cortado en estas figuras. **E.** Gráfico que muestra la relación entre la corriente y la respuesta en voltaje para la célula representada en A-D. Nótese que la gabazina produce un incremento en la resistencia de entrada. **F.** Histograma que muestra los valores medios de resistencia de entrada para toda la población (n=12) en condiciones control y en las otras tres situaciones estudiadas.

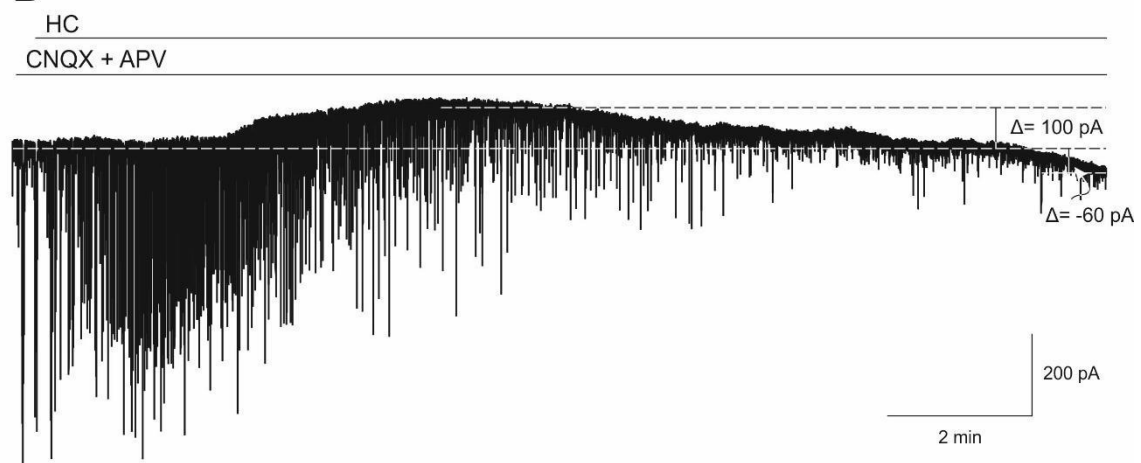
Para determinar si las motoneuronas presentan esta corriente tónica dependiente de GABA, se realizaron experimentos de fijación de voltaje en los que se añadió a la cámara de registro gabazina (20 μ M), en ausencia de GABA exógeno y en presencia de CNQX (50 μ M) y APV (20 μ M) para bloquear las corrientes glutamatérgicas ($n = 10$). En estas condiciones, las sIPSC se bloquearon, y se desenmascaró una corriente de carácter tónico ($51,0 \pm 10,7$ pA; Figura 5.20.A) como consecuencia del bloqueo de los receptores GABA_A. Como se observa en la figura 5.20.B, al realizar el mismo experimento sustituyendo la gabazina por HC observamos que aparece una corriente de características semejantes a la anterior, aunque esta vez los eventos sinápticos no desaparecen, sino que disminuyen en frecuencia y amplitud. Esta corriente se mantiene estable hasta que comienza a disminuir aproximadamente a los 7 minutos desde la aplicación del HC ($50,6 \pm 13,9$ pA; $-23,1 \pm 8,2$ a los 7 min; Figura 5.20.B). Este comportamiento concuerda perfectamente con los efectos del HC descritos anteriormente en este apartado de resultados. Por último, realizamos otro grupo de experimentos en los que comprobamos que al añadir HC a la perfusión tras la gabazina no se produjo ningún efecto sumatorio sobre la corriente tónica ($48,2 \pm 12,3$ pA con HC vs. $51,0 \pm 10,7$ sin HC; Figura 5.20.C). Todos estos resultados parecen indicar que el HC abole la corriente tónica mediada por los receptores GABA_A. Por tanto, proponemos que la LPO provocaría una fase transitoria y temprana de hiperexcitabilidad neuronal como consecuencia del bloqueo de esta corriente tónica inhibidora GABAérgica.

Figura 5.20. Caracterización de la corriente tónica GABAérgica y su papel en la despolarización del potencial de membrana. **A.** Registro electrofisiológico en fijación de voltaje donde podemos observar los efectos de la gabazina (inhibidor de los receptores GABA_A) sobre la corriente necesaria para fijar el voltaje a -70 mV y sobre los eventos sinápticos de la neurona registrada. Podemos observar la existencia de una corriente tónica GABAérgica de 30 pA de amplitud que se hace evidente en cuanto la gabazina hace su efecto. Nótese la rapidez de la gabazina para abolir los eventos sinápticos de la neurona. Para este registro y los siguientes se ha perfundido en la cámara de registro CNQX y APV como inhibidores glutamatérgicos con el fin de observar solamente componentes dependientes de GABA. **B.** Registro en fijación de voltaje que muestra el efecto del HC sobre la corriente necesaria para fijar el voltaje a -70 mV. En esta figura, al igual que en la figura anterior, observamos la afectación de una corriente tónica GABAérgica, que en esta célula alcanza unos 100 pA de amplitud, tras la adición de HC. Nótese que posteriormente el HC provoca la despolarización del potencial de membrana y una disminución en la frecuencia y amplitud de los eventos sinápticos como se ha descrito en figuras anteriores. **C.** Registro en fijación de voltaje donde se muestra el efecto de la adición de gabazina y HC sobre la corriente necesaria para mantener el voltaje a -70 mV. Al igual que en la figura A la gabazina evidencia la presencia de una corriente tónica GABAérgica de 45 pA de amplitud que se acompaña de la desaparición de los eventos sinápticos de la neurona registrada. El HC no produce ningún efecto adicional sobre esta corriente, pero sí observamos que provoca la despolarización del potencial de membrana de la neurona como se ha descrito anteriormente.

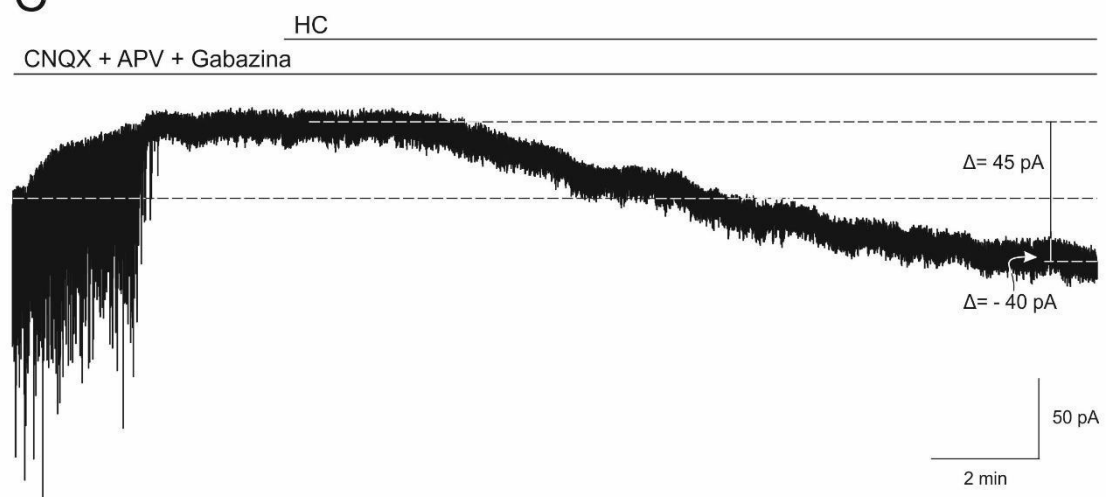
A



B



C



5.15. Prevención de la peroxidación lipídica causado por el hidroperóxido de cumeno mediante preincubación con melatonina.

Con el objeto de demostrar que el HC efectivamente induce una situación de estrés oxidativo, medimos por medios bioquímicos la LPO de la membrana de las neuronas de la corteza motora tras la administración de HC. La figura 5.21.A ilustra en rodajas de cerebro que contienen corteza motora la LPO, expresada como los incrementos (en porcentaje) comparados con la situación control a 0 (control), y expuestas a 1, 10 y 100 μM de HC, durante 0, 5, 15 y 30 minutos. Como se ve en la figura 5.21.A, el HC induce la LPO de una manera dosis y tiempo dependiente. Un mayor tiempo o una mayor dosis causa un incremento progresivo de LPO, significativo a los 5 minutos para las 3 concentraciones estudiadas respecto al control. Sin embargo, el incremento de la LPO alcanza un estado estable ("plateau") en el minuto 15. Además, se puede observar que el nivel de LPO con 1 μM de HC en el minuto 30 es similar al valor medio obtenido tras 5 minutos de exposición a 10 μM . A pesar de que el incremento en LPO es dosis dependiente, principalmente en tiempos cortos, estos incrementos no son proporcionales a la concentración. Por ejemplo, los incrementos observados con 100 μM de HC son mayores, pero no estadísticamente diferentes, a los observados con 10 μM de HC. En cambio, estos efectos sí son significativamente diferentes cuando comparamos 10 frente a 1 μM de HC.

Por último, quisimos estudiar si el antioxidante melatonina era capaz de proteger las membranas celulares del efecto de la LPO inducida por el HC. En primer lugar y a modo de control se estudió si existían diferencias en el grado de LPO entre los tejidos tratados con melatonina y los no tratados, y posteriormente se analizó si los tejidos previamente tratados con melatonina resistían la LPO producida por HC. Estos experimentos ($n=6$) revelaron que no existían diferencias entre la LPO en las células tratadas con LCR artificial y 50 μM de melatonina respecto al control (sólo LCR artificial). Además, como se observa en la figura 5.21.B, la melatonina previno la LPO inducida por 10 μM de HC, no existiendo diferencias significativas entre los tejidos tratados solo con melatonina (control de melatonina) y los tejidos tratados con melatonina más 10 μM de HC, a los 5, 15 o 30 minutos. A pesar de no existir diferencias significativas, se observó un ligero incremento en el grado de LPO a los 30 minutos de perfusión con HC. Independientemente del tiempo de aplicación (5, 15 y 30 minutos) las diferencias encontradas en LPO entre los tejidos tratados con LCR artificial más 10 μM de HC, y los tejidos tratados con LCR artificial más un cóctel formado por 10 μM de HC y 50 μM de melatonina fueron siempre significativas (Figura 5.21.B).

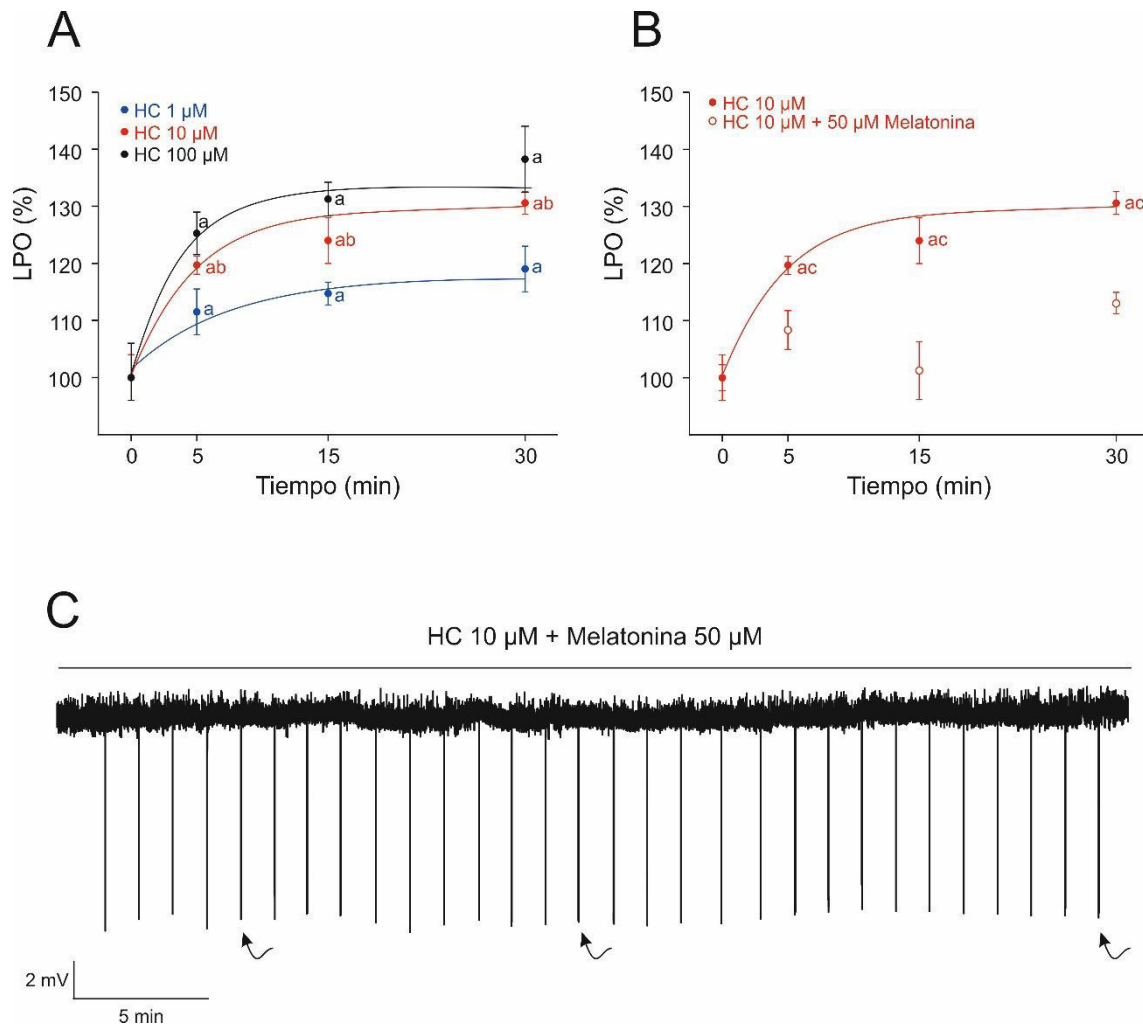


Figura 5.21. Prevención de la peroxidación lipídica con melatonina. **A.** Gráfico que muestra los valores de LPO, expresados en %, a los 0, 5, 15 y 30 minutos tras la exposición a HC 1 μ M (azul; n=6), 10 μ M (rojo; n=6) y 100 μ M (negro; n=6). **B.** Gráfico que muestra los valores de LPO, expresados en %, a los 0, 5, 15 y 30 minutos tras la exposición a HC 10 μ M (n=6) y a HC 10 μ M más melatonina 50 μ M (n=6). **C.** Registro electrofisiológico que muestra que el potencial de membrana y las respuestas en voltaje a pulsos de corriente negativa de -100 pA y 500 ms permanecen estables a lo largo de 30 minutos de exposición a HC 10 μ M + 50 μ M de melatonina. Las flechas señalan las respuestas en voltaje a los 5, 15 y 30 minutos. La letra “a” indica una diferencia significativa en relación a la situación control, “b” representa una diferencia significativa entre una concentración y la precedente para el mismo periodo de tiempo y “c” muestra una diferencia significativa entre la aplicación de HC 10 μ M y HC 10 μ M + melatonina 50 μ M para el mismo periodo de tiempo.

Mediante las aproximaciones bioquímicas antes mencionadas observamos que la melatonina previene la LPO inducida por el HC. Por ello nos preguntamos si un pre-tratamiento de las rodajas de cerebro con este antioxidante podría actuar como neuroprotector y podría prevenir los cambios en las propiedades intrínsecas de membrana inducidos por 10 μ M HC (n=6). La figura 5.21.C ilustra los efectos de la aplicación de 50 μ M de melatonina más 10 μ M de HC sobre el potencial de membrana durante 30 minutos. Como se ve en la figura, no se observan

cambios en el potencial de membrana ni en la resistencia de membrana durante todo el tiempo de registro. La misma respuesta se obtuvo en 4 de las 6 neuronas estudiadas en las que no se observaron cambios en el potencial de membrana, resistencia de membrana o propiedades de disparo. No obstante, en 2 de las 6 células sí mostraron un descenso en la ganancia alrededor del minuto 30. De estos datos pudimos concluir que el HC produce LPO y que esta peroxidación puede ser prevenida, al menos en parte, por la preincubación de las neuronas con el antioxidante melatonina.

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. Consideraciones generales.

Los resultados obtenidos muestran alteraciones significativas en las propiedades electrofisiológicas de la membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora y en sus entradas sinápticas como consecuencia de la LPO. Estos resultados, hasta la fecha, se han publicado en 3 revistas científicas, se han presentado a 3 congresos y han originado una patente. En los siguientes apartados se discutirán los resultados en el orden de los objetivos planteados en la tesis doctoral. Estos se compararán con el efecto producido por oxidantes, como el agua oxigenada o el propio HC, en estudios en neuronas piramidales, en otras poblaciones de motoneuronas como el hipogloso, o en otros tipos neuronales. En primer lugar, en el siguiente apartado comenzaremos con la discusión de las ventajas y las limitaciones del método utilizado. Y terminaremos la discusión presentando las implicaciones funcionales de los resultados obtenidos.

6.2. Consideraciones metodológicas.

El estrés oxidativo ocurre, como hemos explicado anteriormente en el apartado de introducción, cuando la producción de ROS excede a la capacidad antioxidante de los tejidos (Martin y Teismann, 2009; Ljubisavljevic, 2016; Sims-Robinson y col., 2013). En casos de daño neuronal, se cree que estos niveles elevados de ROS contribuyen en gran parte a la degeneración neuronal, lo que podría constituir uno de los factores relacionados con el desarrollo de diferentes enfermedades neurológicas como la ELA, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer (Andersen, 2004; Reynolds y col., 2007). Aunque hay numerosos mecanismos fisiopatológicos que provocan la vulnerabilidad de las neuronas motoras en la ELA, el estrés oxidativo se ha descrito como un factor importante en el caso de la muerte de las neuronas piramidales de la corteza motora (Cleveland y Rothstein, 2001; Kim y col., 2014). Basándonos en evidencias de diversos estudios previos, como los de Nakaya y colaboradores (1992) o Vimard y colaboradores (2011), un compuesto que simula los efectos celulares que produce el estrés oxidativo es el HC. Este compuesto es un agente oxidante orgánico estable que tiene el grupo funcional peróxido, -O-O-, en su fórmula molecular, el cual es el responsable de inducir la LPO que afecta a la membrana celular (Ayala y col., 2014). Se ha descrito que el HC tiene una mayor capacidad para inducir estrés oxidativo que el H_2O_2 , incluso a concentraciones relativamente bajas (Jovanovic y Jovanovic, 2013). Para la primera parte de nuestro estudio se seleccionó una concentración de 10 μM de HC y un tiempo total de perfusión de 30 minutos, durante los cuales se analizaron los distintos parámetros electrofisiológicos estudiados a los 5, 15 y 30 minutos. Cai

y colaboradores (2009), demostraron que el MDA, un intermediario de la LPO, daña de manera gradual a las neuronas del hipocampo tras la exposición durante 3 horas a distintas concentraciones (1, 10, 100 y 1000 μM). De acuerdo con estos autores, el MDA puede tener efectos bioquímicos sobre las neuronas del hipocampo y estos efectos son tiempo y dosis dependientes. A la misma conclusión se llegó en otros trabajos en los que se estudiaron los efectos dosis respuesta de la toxicidad del HC en cultivos celulares (Shimura y col., 1985; Vimard y col., 1996 y 2011, Vroegop y col., 1995). Estos estudios probaron que la ratio de mortalidad celular es muy baja (menos del 5%) cuando se aplica el HC en concentraciones inferiores a 1mM durante periodos inferiores a 30 minutos. Sin embargo, en estos mismos estudios se comprobó que la ratio de mortalidad puede alcanzar hasta un 70% cuando se alargan los tiempos de administración (entre 60 y 180 minutos) o cuando se utilizan concentraciones mayores. Basándonos en estas evidencias, para la segunda parte de nuestra investigación decidimos usar 3 concentraciones distintas de HC (1, 10 y 100 μM) durante 30 minutos, lo cual garantiza una ratio baja de mortalidad celular, para estudiar los efectos dosis y tiempo dependientes del HC. Al igual que en la primera fase de nuestra investigación durante la administración del oxidante hemos analizado numerosos parámetros electrofisiológicos registrando datos a los 5, 15 y 30 minutos desde el comienzo de la aplicación del HC para identificar posibles alteraciones en las propiedades de membrana. Es importante remarcar que antes de realizar todo lo descrito anteriormente, comprobamos que las neuronas de la corteza motora mantienen estables sus propiedades de membrana, bajo nuestras condiciones de registro, durante 30 minutos, como se había demostrado previamente en otra población neuronal (Nani y col., 2010). Por esta razón, cualquier alteración de los parámetros fisiológicos analizados puede ser considerada efecto de la administración del oxidante y no de las condiciones de registro.

En nuestro trabajo de investigación hemos estudiado las neuronas piramidales de la capa V de la zona cerebral frontal y más concretamente de la corteza motora primaria. Esta zona está implicada en la ejecución de los movimientos voluntarios, el control fino (preciso) de estos movimientos, así como en el aprendizaje de nuevas habilidades motoras (Hosp y col., 2011; Oswald y col., 2013). El motivo de su elección fue el conocimiento de que la corteza motora primaria es la región que más se afecta en algunas enfermedades neurodegenerativas, como la ELA (Mochizuki y col., 2011). En las neuronas seleccionadas para su registros hemos estudiado sus propiedades pasivas y activas de membrana mediante protocolos electrofisiológicos en los que los directores de esta tesis tienen una amplia experiencia (ver Núñez-Abades y col., 1993 o Carrascal y col., 2006).

6.3. Alteraciones en las propiedades pasivas de membrana por estrés oxidativo.

Se observaron cambios en las distintas propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales, entre ellas el potencial de membrana y las propiedades pasivas de la célula, por el efecto del estrés oxidativo producido por la exposición al HC. El potencial de membrana en reposo de las neuronas se fue despolarizando progresivamente durante la exposición al HC. Este resultado es acorde con el obtenido por Nakaya y colaboradores (1992) en células cardíacas, en el que se propone que, al menos en parte, la despolarización se produce por la inhibición de la actividad de los canales de K^+ . En motoneuronas del hipogloso, utilizando un modelo de estrés oxidativo (Nani y col., 2010), se demostró que los agentes oxidantes producen un bloqueo de los canales de fuga de K^+ tipo TASK-1 presentes en dichas motoneuronas. En estas neuronas la despolarización cursa en paralelo con un aumento en la resistencia de la membrana. La similitud en los resultados obtenidos en nuestro estudio (despolarización en paralelo a un aumento en la resistencia), nos permitió proponer, en un principio, que en los primeros minutos de aplicación del oxidante deben de estar alterándose las conductancias de K^+ propuestas en los estudios anteriormente citados. No obstante, estas conductancias afectadas no deben estar participando en la determinación del voltaje umbral, ya que según nuestros resultados permaneció inalterado. De hecho, la disminución del potencial de membrana cursó en paralelo con una disminución de la misma magnitud del voltaje de despolarización necesario para producir un potencial de acción. En el estudio de Nani y colaboradores (2010) se demuestra que el estrés oxidativo produce una disminución de las conductancias persistentes voltaje dependientes de Na^+ y Ca^{2+} , sin que se afecte el umbral de activación de los canales implicados (Nani y col., 2010). Podemos concluir, por tanto, que el umbral de activación de los canales voltaje dependiente de Na^+ responsables de la generación de potenciales de acción, en nuestra investigación, reside en una zona de la proteína canal que no se ve alterada por estrés oxidativo.

La resistencia de la membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora experimentó un aumento a los 5 minutos de la exposición al HC, para luego disminuir con respecto al valor control a los 15 y 30 minutos. Estos cambios en resistencia podrían estar poniendo de manifiesto alteraciones en la permeabilidad de la membrana, o la activación o inactivación de conductancias presentes en la membrana en condiciones de reposo. De hecho nuestros resultados indican que las conductancias catiónicas mixtas o I_h , responsables del sag, se inactivan en las neuronas piramidales por efecto del HC. Nani y colaboradores (2010) encontraron en las motoneuronas del hipogloso que la administración de H_2O_2 produjo un aumento de la resistencia, mientras que la exposición a H_2O_2 en neuronas talámicas y corticales produjo en ellas una disminución de la resistencia (Frantseva y col., 1998). De estos estudios se podría concluir

que el estrés oxidativo influye de forma sustancial sobre la resistencia de la membrana, aunque de forma diferente, en función de cuál sea la población neuronal estudiada y del tipo de oxidante. En nuestra investigación encontramos que la membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora, en respuesta al HC, se comporta como una resistencia óhmica, es decir sigue la Ley de Ohm, y cualquier modificación en la resistencia produce un cambio compensatorio y de igual magnitud en la reobase. Como consecuencia de ello, cabría esperar que si solo se afectara este parámetro fisiológico se produciría un aumento en la excitabilidad en los 5 primeros minutos de aplicación de HC, como el observado en motoneuronas del hipogloso (Nani y col., 2010), para posteriormente sufrir una drástica disminución en la misma por la exposición continuada al HC como se ha descrito en neuronas talámicas (Frantseva y col., 1998). Sin embargo, esta predicción contrasta con los resultados obtenidos en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales, lo que indica que también se alteran las propiedades activas de la membrana.

Analizando los datos obtenidos en la segunda fase de nuestro estudio (estudio dosis respuesta), y siguiendo con las propiedades pasivas, no se observaron efectos sobre el potencial de membrana ni sobre la resistencia en condición control ni cuando se administró 1 μM de HC. A dicha concentración, y a pesar de que encontramos niveles significativos de LPO (Pardillo-Díaz y col., 2016), parece que la célula es capaz todavía de bloquear los efectos del estrés oxidativo sobre las propiedades fisiológicas de la membrana. Este resultado podría deberse a que las neuronas piramidales tienen un sistema eficiente de enzimas secuestradoras de radicales libres que reacciona rápidamente con 1 μM de HC, como han propuesto Jovanovic y Jovanovic (2013) al intentar explicar los efectos que el estrés oxidativo tiene sobre las propiedades electrofisiológicas en las neuronas Retzius de sanguijuelas. Los valores medidos de LPO que hemos encontrado cuando se administra la concentración de 1 μM son un 15% superior a los valores obtenidos en condiciones control. Estos valores son bajos y similares a los encontrados durante el envejecimiento en el hipotálamo-hipófisis (Argüelles y col., 2011). Según lo que hemos observado, estos niveles de LPO no serían suficientemente elevados para provocar alteraciones en las propiedades de membrana. Contrariamente a los resultados obtenidos con la concentración de 1 μM , la exposición de las neuronas corticales a 10 y 100 μM de HC sí produce cambios en el potencial de membrana, resistencia de membrana y reobase como resultado de niveles elevados de LPO. Analizando nuestros resultados realizamos una observación inesperada, ya que estas dos concentraciones causan cambios de igual magnitud en estos parámetros. Este descubrimiento puede explicarse mediante otra observación interesante que hemos realizado sobre los valores de LPO que encontramos cuando administramos 100 μM ya que éstos son ligeramente superiores, pero no significativos, a los obtenidos con 10 μM . Nuestros resultados,

como hemos comentado anteriormente, sugieren que el estrés oxidativo afecta a los canales y/o conductancias que determinan las propiedades pasivas de membrana (Frantseva y col., 1998; Nakaya y col., 1992; Nani y col., 2010; Pardillo-Díaz y col., 2015) en un rango de concentraciones muy estrecho (1-10 μM), lo cual se asemejaría a una respuesta de tipo todo o nada.

6.4. Alteraciones en las propiedades activas de membrana por estrés oxidativo.

Al igual que las propiedades pasivas, las propiedades activas también se ven afectadas por la administración de HC. En nuestro estudio se observó que la amplitud del potencial de acción disminuyó mientras que su duración aumentó, de forma progresiva, a lo largo del tiempo de exposición al HC. Podemos encontrar datos similares en el estudio realizado por Jovanovic y Jovanovic (2013) sobre las neuronas de sanguijuela. Tanto la aplicación de H_2O_2 como de HC, produjo un ensanchamiento de los potenciales de acción. Este trabajo sugiere, además, que la afectación de las propiedades del potencial de acción es tiempo-dependiente ya que se acusa su efecto a lo largo de los 5, 10, 12, 15 y 20 minutos de exposición a 1,5 mM de HC. Al igual que en el trabajo de Nakaya y colaboradores (1992), Jovanovic y Jovanovic (2013) proponen como mecanismo implicado que el HC bloquea los canales de K^+ , especialmente los activados por calcio. Sin embargo, es más plausible que la reducción de otras conductancias, que se han demostrado sensibles al estrés oxidativo en neuronas de CA1 de hipocampo (Angelova y Müller, 2006) y que son necesarias para la repolarización del potencial de acción como son la corriente transitoria voltaje dependiente I_A , o la conductancia rectificadora de K^+ , podrían estar afectándose en nuestra investigación, lo que explicaría nuestros resultados. Adicionalmente, la bajada en amplitud del potencial de acción, que ocurre de forma gradual por la exposición al HC, puede ser un reflejo de la disminución de la fuerza electromotriz de Na^+ , debido a la alteración de los gradientes iónicos por la afectación de los transportadores iónicos presentes en la membrana plasmática. De hecho, se ha demostrado que las bombas iónicas y la permeabilidad de la membrana del retículo endoplasmático se ven alteradas por el estrés oxidativo (Racay y col., 1997), algo que también puede estar ocurriendo en la membrana plasmática.

En cuanto al efecto del HC sobre las propiedades repetitivas de disparo observamos una cierta diversidad en las neuronas piramidales estudiadas durante la primera fase de la experimentación. Algunas de ellas (13/30) dejaron de disparar potenciales de acción a lo largo de los pulsos despolarizantes, mientras que otras (17/30) conservaron el disparo repetitivo. No obstante, estas últimas mostraron una disminución tanto en la frecuencia máxima de disparo como en la ganancia de la frecuencia de potenciales de acción, indicando que podrían estar mostrando los primeros síntomas de la afectación al HC que posteriormente conduce a la pérdida

completa del disparo. En cualquier caso, estas neuronas que conservan el disparo repetitivo tuvieron un rango de trabajo mucho menor, puesto que presentaron una mayor reobase, y cancelan su disparo a corrientes menores a la de la situación control. Este hecho contrasta con los resultados obtenidos por Nani y colaboradores (2010) donde con su modelo de estrés oxidativo con H_2O_2 (1 mM; 30 min) observaron un aumento en el disparo de las motoneuronas del hipogloso de rata. Por el contrario, nuestros resultados coinciden con los mostrados por Jovanovic y Jovanovic (2013) en el que el HC (1,5 mM; 20 min) produjo la cancelación completa de las propiedades de disparo en neuronas de sanguijuela. En motoneuronas del hipogloso se ha demostrado que el H_2O_2 disminuye las conductancias persistentes de Na^+ (Nani y col., 2010) que pueden provocar una bajada en la excitabilidad cuando se bloquean por completo (Lamanauskas y Nistri, 2008). Adicionalmente, se puede postular que el bloqueo de las corrientes rectificadoras de potasio por el estrés oxidativo, las cuales participan en la repolarización del potencial de acción, alteran la excitabilidad neuronal (Hasan y col., 2013). Sin embargo, es más plausible que la pérdida de la capacidad de producir un disparo repetitivo se pueda explicar por la bajada en la probabilidad de la apertura de los canales voltaje dependientes de Na^+ y ésta podría ser la principal alteración que puede comprometer el normal funcionamiento neuronal, ya que impediría la producción de potenciales de acción. De hecho, en la figura 5.5.B-D se observa la cancelación en la generación de potenciales de acción en puntos del registro donde se consigue alcanzar el umbral. Está demostrado que el H_2O_2 puede afectar a la probabilidad de apertura de canales voltaje dependientes vía oxidación de un residuo de cisteína de la proteína del canal (Huang y col., 2009).

Como hemos comentado antes Jovanovic y Jovanovic (2013) han demostrado que la exposición de neuronas de sanguijuela a HC (0,25, 1, y 1,5 mM) provoca la ampliación de la duración del potencial de acción pero además, dicha ampliación ocurre de una manera dosis dependiente. Por ejemplo, con la concentración de 0,25 mM el potencial de acción no cambió significativamente a lo largo de 20 minutos, pero este cambio sí fue significativo con 1 mM. Además, una concentración mayor (1,5 mM) de HC causó un cambio evidente en la forma y la duración del potencial de acción. Analizando los datos de la segunda fase de nuestro estudio, hemos observado que el potencial de acción disminuye mientras que su duración se ve incrementada de manera progresiva a lo largo del tiempo de exposición al HC de manera dependiente de la concentración. Cuando administramos la concentración de 1 μM de HC los efectos sobre la amplitud del potencial de acción fueron evidentes a los 30 minutos de exposición al oxidante. Sin embargo, con las concentraciones de 10 y 100 μM los efectos fueron significativos a los 5 minutos de exposición, mostrando las mayores alteraciones en amplitud cuando se

administró la concentración de 100 μM de HC. Como se ha descrito anteriormente, se ha propuesto que el estrés oxidativo puede afectar a las conductancias que participan en la repolarización del potencial de acción y en los gradientes iónicos de Na^+ (Angelova y Müller, 2006; Jovanovic y Jovanovic, 2013; Nakaya y col., 1992; Pardillo-Díaz y col., 2015). La capacidad de mantener el disparo repetitivo de potenciales de acción es, probablemente, la propiedad eléctrica que más se ve afectada por el HC. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Jovanovic y Jovanovic (2013) en los cuales, como hemos comentado antes, el HC (1,5 mM, 20 min) produjo una cancelación completa de las propiedades de disparo en neuronas de sanguijuelas. Sin embargo, y al igual que ocurre con los datos obtenidos en la primera fase de nuestra investigación, nuestros resultados no coinciden con los obtenidos en su estudio por Nani y colaboradores (2010) en el cual usaron un modelo de estrés oxidativo con H_2O_2 (1 μM , 30 min) que causó un incremento del disparo en las motoneuronas del hipogloso de ratas. Esta discrepancia puede ser debida al hecho de que el H_2O_2 solamente puede alcanzar los efectos producidos por el HC cuando se usa a concentraciones 10 veces superiores (Vimard y col., 2011). En cualquier caso e independientemente de cuáles son los canales y/o conductancias responsables de la generación de potenciales de acción y del disparo repetitivo (Pardillo-Díaz y col., 2015), en nuestro estudio hemos demostrado que éstos se afectan por el estrés oxidativo de una manera dosis dependiente.

6.5. Depresión del flujo de entradas sinápticas desde las interneuronas premotoras.

En los dos primeros abordajes experimentales de esta tesis doctoral hemos demostrado que el estrés oxidativo inducido por el HC provoca cambios dosis y tiempo dependientes en las propiedades funcionales de las neuronas piramidales de la corteza motora, comprometiendo la excitabilidad neuronal y la capacidad de disparar potenciales de acción de forma repetitiva (Pardillo-Díaz y col., 2015, 2016). Llegados a este punto nos preguntábamos si algunos de los cambios descritos en las propiedades de membrana, en particular la resistencia de membrana y la reobase, podrían ser resultado de las modificaciones en la liberación de neurotransmisores sobre las neuronas piramidales. Previamente se ha descrito que el estrés oxidativo, inducido mediante peróxido de hidrógeno, afecta a la transmisión sináptica que reciben las motoneuronas del hipogloso caracterizado por una reducción significativa de la frecuencia de los eventos sinápticos espontáneos (Nani y col., 2010). Para evaluar la influencia de la transmisión sináptica en las neuronas piramidales de la corteza motora hemos analizado exhaustivamente los sEPSC y sIPSC en condiciones control y tras la aplicación de HC al baño. Hemos seleccionado la concentración de 10 μM de HC durante 30 minutos ya que, como hemos visto antes, estos valores

producen cambios en las propiedades pasivas y activas de la membrana garantizando una ratio de muerte celular menor al 5% (Vimard y col., 2011). Nuestros resultados indicaron que el HC induce una depresión sináptica en las neuronas piramidales de forma tiempo dependiente. La frecuencia media de los sEPSC permanece inalterada a los 5 minutos pero desciende significativamente un 33% respecto del control tras 15 minutos de aplicación de HC. Sin embargo, la frecuencia media de los sIPSC se ve afectada antes ya que desciende significativamente un 27% respecto del control a los 5 minutos de la aplicación del HC (Pardillo-Díaz y col., 2017). Estos resultados observados siguen la línea de los obtenidos por Frantseva y colaboradores (1998) en un estudio en el que demostraron que la aplicación de peróxido de hidrógeno durante 4 minutos disminuye los IPSP en un 35% respecto al control en neuronas corticales y un 42% en neuronas talámicas, y que tras 6 minutos de aplicación las respuestas postsinápticas inhibitoras se abolen en un 70% en las neuronas corticales y en un 67% en el caso de las talámicas (Frantseva y col., 1998). Estos autores también afirmaron que la disminución progresiva de la transmisión sináptica inhibitora comenzó inmediatamente después de la exposición al peróxido de hidrógeno.

Nuestros resultados también indican que la amplitud y la constante de bajada de los sEPSC y sIPSC disminuyen por la exposición al HC. Es bien conocido que el tamaño y la duración de las corrientes postsinápticas espontáneas están determinados por la cantidad de neurotransmisor liberado, ya que reducir la liberación de neurotransmisores aumenta la velocidad (y por tanto disminuye el tiempo) de la constante de bajada de las corrientes postsinápticas espontáneas (Takahashi y col., 1995). Los datos obtenidos en nuestro estudio sugieren que la caída de la concentración de glutamato y GABA, respectivamente, en el espacio sináptico puede explicar la disminución en la amplitud y la constante de tiempo de las corrientes postsinápticas espontáneas. Además, en presencia de TTX, (abordaje experimental en el que solo se observa la liberación independiente de potencial de acción), los valores de frecuencia, amplitud y constante de bajada obtenidos en mEPSC y mIPSC no varían tras 15 minutos de aplicación de HC. De estos datos podemos concluir que los efectos del HC sobre la amplitud de los eventos sinápticos y su cinética pueden ser explicados por el bloqueo de los componentes de las corrientes postsinápticas espontáneas que son mediados por potencial de acción, sin verse afectados los mecanismos que gobiernan la fusión de las vesículas con la membrana presináptica, la tasa o velocidad de recaptura de neurotransmisores del espacio sináptico o las propiedades de los receptores de neurotransmisores postsinápticos. De nuestros hallazgos podemos concluir que el flujo de entradas desde las interneuronas premotoras a las neuronas piramidales es extremadamente sensible a la exposición al HC y por ello, a la LPO (Pardillo-Díaz y col., 2017). Aun así, existen estudios que muestran que el HC a concentraciones por debajo de la requerida para

provocar la LPO afecta a la liberación de Ca^{2+} desde la mitocondria (Bindoli, 1988; Gogvadze y Zhukova, 1991). Por esto, no podemos descartar que, además de la LPO, otros mecanismos pueden estar afectando a las entradas sinápticas como la disfunción mitocondrial y la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} (Pardillo-Díaz y col., 2017).

6.6. Origen de la despolarización del potencial de membrana por estrés oxidativo.

Como ya hemos comentado anteriormente en varias ocasiones, el HC provoca una disminución del potencial de membrana en reposo de las neuronas piramidales. Esta despolarización del potencial de membrana puede deberse al aumento de una corriente de entrada y/o a una disminución de una corriente de salida. En nuestro estudio hemos demostrado que el HC provoca una corriente de entrada (despolarización) de desarrollo lenta que no está mediada por neurotransmisores, ya que puede observarse en presencia de TTX. Nakaya y colaboradores han afirmado que en células cardíacas aisladas de cobaya la despolarización de la membrana causada por el HC no está asociada con la disminución en el potencial de equilibrio del potasio, provocada por la fuga de K^+ intracelular (Nakaya y col., 1992). Estos autores concluyen que la despolarización del potencial de membrana en reposo inducido por el estrés oxidativo es debido, al menos en parte, a la inhibición de la actividad del canal rectificador de entrada de K^+ . Apoyaría esta propuesta los resultados obtenidos tras la aplicación de peróxido de hidrógeno en neuronas de sanguijuelas durante 20 minutos que produce cambios en las propiedades eléctricas, incluyendo la despolarización de la membrana y la inhibición de la corriente de salida de potasio responsable de la repolarización de los potenciales de acción (Jovanovic y col., 2016). Además, como ya hemos mencionado anteriormente, Nani y colaboradores usando peróxido de hidrógeno en motoneuronas del hipogloso han comprobado que se produce una corriente de entrada, o despolarización de la membrana, acompañada de un incremento en la resistencia de membrana (Nani y col., 2010). Este último descubrimiento implica la depresión de una corriente de fuga de K^+ , que no es inhibida por el Cs^+ intracelular contenido en la pipeta de patch (Fisher y Nistri, 1993) y que puede subyacer a la inhibición de los canales de fuga de K^+ de tipo TASK-1 (Bayliss y col., 2001; Talley y col., 2000). Con todos estos datos podemos proponer que alteraciones en las corrientes descritas anteriormente podrían también ser responsables de la despolarización que observamos en las neuronas piramidales tras la exposición al HC. Independientemente de qué conductancias y/o canales medien los cambios en el potencial y resistencia de membrana, hemos demostrado en nuestros experimentos que la despolarización del potencial de membrana y el incremento de la resistencia inducidos por el estrés oxidativo no están relacionados y obedecerían a mecanismos diferentes.

6.7. La depresión de una corriente tónica dependiente de receptores GABA_A subyace a la hiperexcitabilidad neuronal producida por estrés oxidativo.

Es esperable que aquellas neuronas que presenten una mayor resistencia de entrada sean aquellas que presenten una mayor excitabilidad. Nuestros datos sugieren que el HC induce una depresión sináptica, especialmente relevante en la transmisión sináptica GABAérgica, a los 5 minutos de aplicación del oxidante. Esta última observación se correlaciona con el incremento transitorio de la resistencia de entrada encontrado en los experimentos en fijación de corriente tras 5 minutos de aplicación de HC. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto global de la LPO inducida por el HC condujo a una depresión del flujo de entradas desde las interneuronas premotoras, lo cual provocaría una inesperada hiperexcitabilidad transitoria en las neuronas piramidales de la corteza motora. Esta hiperexcitabilidad en neuronas piramidales de otras cortezas también se ha observado tras su exposición a peróxido de hidrógeno (Frantseva y col., 1998). Estos autores concluyen que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de alteraciones en el circuito talamocortical por la atenuación de la neurotransmisión inhibitoria, entre otros factores. Es conocido que las interneuronas GABAérgicas juegan un papel principal en la reducción de la excitabilidad neuronal en la corteza (Wagle-Shukla y col., 2009) y en otras poblaciones de motoneuronas (Torres-Torrelo y col., 2014). Las interneuronas GABAérgicas están implicadas en circuitos neuronales locales que constituyen aproximadamente el 15-20% del total de las neuronas de la corteza, las cuales durante el desarrollo adaptan sus funciones para realizar el control fino de los movimientos motores (Batista-Brito y Fishell, 2009; Biane y col., 2015; Kepecs y Fishell, 2014). Se ha demostrado que una corriente tónica activada por una baja concentración de GABA, que puede ser bloqueada por gabazina, domina la transmisión GABAérgica en las células piramidales neocorticales de animales neonatales, ejerciendo efectos muy heterogéneos sobre la excitabilidad neuronal (Sebe y col., 2010). Nuestros resultados sugieren que la LPO provoca una hiperexcitabilidad transitoria en las neuronas piramidales principalmente a través de la alteración de una corriente tónica dependiente de receptores GABA_A que desinhibe a las neuronas corticales de la corteza motora aumentando su resistencia de entrada y disminuyendo su reobase. No obstante, no se puede descartar la participación de las corrientes fásicas inhibitorias en este incremento de la excitabilidad aunque se supone minoritario (Sebe y col., 2010), y sin olvidar que también pueden estar disminuyendo las influencias que ejercen las entradas excitadoras, que también hemos demostrado que se ven afectadas.

6.8. Consideraciones funcionales.

Como se ha demostrado en células modificadas del hipocampo (Oh y col., 2012) nuestros datos demuestran que el estrés oxidativo inducido por el HC provoca cambios importantes, de una manera dosis y tiempo dependiente, en la excitabilidad de las neuronas de la corteza motora de ratas. Bajas concentraciones del oxidante ($1 \mu\text{M}$), durante una exposición prolongada, bloquean la corriente I_h subyacente al sag (Robinson y Siegelbaum, 2003) y puede alterar conductancias implicadas en las propiedades del potencial de acción y de disparo, a una magnitud a la que no tiene efectos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos sobre otras poblaciones neuronales (Jovanovic y Jovanovic, 2013; Sinha y col., 2015; Vimard y col., 2011). Una concentración de $10 \mu\text{M}$ de HC produce cambios importantes en las propiedades de membrana de las neuronas piramidales, que pueden comprometer su normal funcionamiento, afectando al potencial de membrana, resistencia de membrana, reobase y en especial a sus propiedades de disparo, como hemos demostrado anteriormente en la primera fase de nuestra investigación (Pardillo-Díaz y col. 2015) de una manera tiempo dependiente. Finalmente, $100 \mu\text{M}$ de HC bloquea completamente la capacidad de producir una descarga repetitiva de potenciales de acción en una exposición prolongada. Una exposición breve (menos de 15 minutos) también provoca el estrechamiento del rango de trabajo ya que se produce un aumento de la reobase y un descenso en la corriente de cancelación. Con estos datos, podemos concluir que concentraciones elevadas de HC durante un periodo breve de exposición tienen consecuencias similares a las provocadas por concentraciones menores cuando se aplican durante largos periodos (Pardillo-Díaz y col. 2016), y que por tanto, bajo niveles de estrés oxidativo mantenido en el tiempo terminan produciendo los mismos efectos que altos niveles de estrés oxidativo en periodos cortos.

Los datos que hemos obtenido demuestran que los efectos inducidos por una exposición breve al HC (5 minutos) son parcialmente reversibles, mientras que los producidos por una exposición más prolongada (15 minutos) son prácticamente irreversibles. De los parámetros analizados, el potencial de membrana y la resistencia son los que presentan una mayor reversibilidad a los efectos del HC. De una manera similar a nuestros datos, el H_2O_2 induce una gran despolarización del potencial de membrana reversible casi en la mitad de los casos en las neuronas talámicas estudiadas (Frantseva y col., 1998). El cambio observado en la resistencia también puede ser revertido en algunos casos pero, por contra, la disminución inducida por el H_2O_2 en la frecuencia de corrientes postsinápticas espontáneas en motoneuronas del hipogloso no puede revertirse (Nani y col., 2010). Esta reversibilidad de algunos de los efectos mediados por el estrés oxidativo es difícil de explicar (Pellmar, 1987). Los radicales de oxígeno producidos

por el HC pueden atacar directamente a las proteínas de los canales iónicos, pero la LPO provocada por el HC también puede inhibir indirectamente las funciones de estos canales iónicos alterando los lípidos de la membrana que rodean a las proteínas del canal (Nakaya y col., 1992). Los efectos susceptibles de ser reversibles pueden ser mediados por la modificación de las interacciones lípido-proteínas en lugar de por la oxidación irreversible de proteínas (Frantseva y col., 1998). Teniendo en cuenta nuestros resultados podemos sugerir que los efectos del HC sobre el potencial de membrana en reposo y sobre la resistencia de membrana son, al menos en parte, una consecuencia indirecta de la LPO y, por esta razón, dichas alteraciones pueden ser parcialmente revertidas con un lavado temprano del oxidante. De hecho, nuestros resultados demuestran que el efecto sobre la resistencia tendría su origen en un mecanismo presináptico por el bloqueo de la liberación de GABA. Por el contrario, los efectos irreversibles que observamos cuando se administra el HC durante un tiempo prolongado deben estar mediados por la afectación de las proteínas lo cual provocaría dicha irreversibilidad.

En las motoneuronas, la capacitancia celular se ha usado como estimación del tamaño neuronal (Viana y col., 1994), en otras palabras, las neuronas de mayor tamaño presentan valores más altos de capacitancia. Nuestros resultados proporcionan la primera evidencia experimental que muestra que las neuronas más afectadas por el estrés oxidativo son las de mayor tamaño, aquellas con los valores más altos de capacitancia. Las neuronas piramidales de la corteza motora son mayores en comparación con las neuronas de otras capas de dicha corteza y de otros núcleos cerebrales (Oswald y col., 2013). Además, con respecto a las neuronas piramidales de la corteza motora, así como de otras áreas corticales, se ha demostrado que los parámetros morfológicos revelan claras diferencias entre las neuronas corticofugales, las cuales poseen un soma de gran tamaño y grandes dendritas muy ramificadas, y las neuronas comisurales que tienen un soma pequeño y dendritas de menor tamaño (Chagnac-Amitai y col., 1990; Mason y Larkman, 1990; Oswald y col., 2013). Con las observaciones y datos analizados durante nuestra investigación proponemos que las neuronas corticofugales serían las más afectadas por el estrés oxidativo. Si consideramos el estrés oxidativo como la causa principal de muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas (Andersen, 2004; Cabungcal y col., 2014; Cleveland y Rothstein, 2001; Niedzielska y col., 2016; Parakh y col., 2013; Reynolds y col., 2007), nuestros hallazgos pueden servir para explicar cómo las neuronas piramidales de la corteza motora, en particular las neuronas corticofugales, tienen el ratio de muerte celular más alto en enfermedades como la ELA, en comparación con otras poblaciones de neuronas motoras.

Entre estos factores que se han propuesto como origen de la ELA encontramos la teoría de la excitotoxicidad por glutamato que enfatiza la contribución de una excesiva excitación sináptica (Bogaert y col., 2010; Fogarty y col., 2015), en parte a través de receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico o AMPA (Heath y Shaw, 2002; Kwak y col., 2010; Sasabe y Aiso, 2010) y canales de Na^+ (Kuo y col., 2004, 2005; Spalloni y col., 2013; Zona y col., 2006). Además, la excitotoxicidad mediada por glutamato puede provocar la muerte celular debido a un incremento en el flujo de Ca^{2+} . Este incremento produce la activación de determinadas enzimas e interfiere con el correcto funcionamiento de la mitocondria causando la muerte neuronal (Do-Ha y col., 2017; Van den Bosch y col., 2006). En pacientes con ELA se ha observado un incremento en la concentración de glutamato en la corteza motora, como muestran diversos estudios de espectroscopía de resonancia magnética (Han y Ma, 2010; Pioro y col., 1999). Este incremento en la concentración puede ser debido a la afectación de los astrocitos ya que son los responsables de la recaptación de glutamato del espacio sináptico, proceso especialmente importante para evitar la sobrestimulación y el daño que esta conlleva (Do-Ha y col., 2017). Sin embargo, esta teoría de la excitotoxicidad tiene un gran inconveniente ya que los agentes anti-glutamatérgicos usados como terapia no tienen un efecto beneficioso muy evidente sobre los pacientes de ELA (Zoccolella y col., 2009). Por otro lado, numerosas evidencias muestran que la inhibición cortical se encuentra alterada en la ELA (Eisen y Weber, 2000; Martin y Chang, 2012; Turner y Kiernan, 2012; Zanette y col., 2002a, 2002b; Ziemann y col., 1997) y que la interrupción de la inhibición puede tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Martin y Chang, 2012). La mayoría de las interneuronas que encontramos en la corteza son inhibitoras y utilizan GABA o glicina (Do-Ha y col., 2017). Se ha observado que en los pacientes de ELA estos neurotransmisores presentan niveles anormales (Malessa y col., 1991; Niebroj-Dobosz y Janik, 1999). Esta hipótesis también se apoya en el descenso que se produce de las concentraciones de GABA en la corteza motora primaria de pacientes con ELA como se ha demostrado con la espectroscopía de resonancia magnética (Foerster y col., 2012) y con el marcaje mediante PET de la distribución de las unidades de receptores de benzodiazepinas en las células piramidales (Lloyd y col., 2000). Analizando la corteza motora en las autopsias de pacientes con ELA se observa que la expresión de ARNm sugiere una regulación a la baja de la expresión de genes que codifican para las subunidades α de los receptores GABA_A (Petri y col., 2003). Diversos estudios con modelos de ELA muestran la existencia de un desequilibrio entre las inervaciones excitadoras e inhibitoras (Avossa y col., 2006; Fogarty y col., 2015). Zhang y colaboradores usaron un modelo de ratón TDP-43 A315T para demostrar que los impedimentos en la señalización GABAérgica contribuyen a la hiperexcitabilidad cortical observada (Zhang y col., 2016). Por otro lado, también se ha observado una desorganización de las interneuronas corticales en humanos en diversos estudios de la

corteza motora primaria, donde puede haber una pérdida de interneuronas calbindina, parvalbúmina y neuropéptido Y positivas en las capas V y VI (DeFelipe y col., 2013; Maekawa y col., 2004; Nihei y Kowall, 1993; Vitalis y Rossier, 2011). En otros estudios realizados con ratones mutantes *wobbler*, que son ratones que presentan una mutación puntual en el gen Vps54 (Schmitt-John y col., 2005) y que se utilizan de forma extendida como un modelo de ELA se ha encontrado una disminución en el número de interneuronas inhibitoras parvalbúmina y somatostatina positivas y un decremento en la densidad de botones sinápticos GABAérgicos en la región de la corteza motora (Nieto-Gonzalez y col., 2011). Además, en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora de estos ratones *wobbler*, la frecuencia de IPSC mediadas por receptores GABA_A se redujo en un 72% y la inhibición tónica mediada por receptores extrasinápticos de GABA_A se redujo también en un 87% en comparación con los datos de ratones control (Nieto-Gonzalez y col., 2011; Moser y col., 2013). Estos autores concluyeron que las neuronas piramidales de los ratones *wobbler* muestran un incremento de la resistencia de entrada y de la excitabilidad como consecuencia de una disminución en las entradas GABAérgicas, fásicas pero sobre todo tónicas, mediadas por receptores de GABA_A. Otro estudio, que apoyaría la teoría de la alteración en inhibición cortical sería el realizado por McGown y colaboradores en 2013, en el que utilizando como modelo el pez cebra mutante SOD1 observaron que la primera población neuronal que muestra niveles elevados de estrés son las interneuronas y que la reducción de corrientes inhibitoras precede a cualquier defecto observado en las neuronas motoras (McGown y col., 2013). Todos estos estudios apoyan nuestros resultados ya que en este trabajo se demuestra que las neuronas piramidales de la corteza motora de ratas reciben una neurotransmisión inhibitora disminuida en las primeras etapas de la LPO, sin una disminución compensatoria de la neurotransmisión excitadora. Esta disminución en la transmisión GABAérgica, tiene como consecuencia, además, que la entrada tónica mediadas por receptores GABA_A quede totalmente deprimida produciendo hiperexcitabilidad cortical. Dado que la hiperexcitabilidad cortical parece ser una característica temprana en la ELA y asumiendo que el estrés oxidativo contribuye al desarrollo de esta patología (Turner y col., 2009; Vucic y Kiernan, 2009), proponemos que la LPO (y por ende el estrés oxidativo), vía alteración de la inhibición cortical (tónica y fásica), contribuye a las causas que se encuentran detrás de las enfermedades neurodegenerativas como la ELA.

Uno de los grandes problemas que se encuentra en clínica para la ELA es la falta de una prueba eficiente para su diagnóstico. Por esta razón es muy necesario que se identifiquen biomarcadores que ayuden a evitar el retraso en el diagnóstico y permitan estratificar a los pacientes según su pronóstico y así se puedan desarrollar terapias eficaces contra esta

enfermedad (Turner y col., 2013). Para la búsqueda de estos biomarcadores se están investigando tanto en biofluidos como en las biopsias de distintos tejidos. Recientemente se ha encontrado un miARN (miARN-206) elevado en plasma de pacientes de ELA (Toivonen y col., 2014) que podría estar relacionado con dicha enfermedad, pero también con el estrés oxidativo, dado que también se encuentra elevado en un modelo de ratón SOD1-G93A. Hay que recordar que, en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple se han estudiado los niveles de miARN con resultados prometedores (Burgos y col., 2014; Denk y col., 2015; Haghighi y col., 2012). Hasta encontrar un biomarcador fiable para esta enfermedad se pueden utilizar otros factores cuantificables de la enfermedad como indicadores. Entre estos indicadores se encontraría la hiperexcitabilidad cortical, que es un rasgo común y temprano de la ELA (Bae y col., 2013; Do-Ha y col., 2017; Vucic y col., 2008), por lo que su medida ofrecería un objetivo potencial para el diagnóstico y el tratamiento.

Como hemos comentado anteriormente, las neuronas tienen diversos mecanismos defensivos frente al estrés oxidativo. Algunos de los compuestos que forman parte de esta defensa son los agentes tiol-reductores, entre los que encontramos la N-acetilcisteína o el β -mercaptoetanol (Cabungcal y col., 2014; Vimard y col., 2011), o sustancias antioxidantes, como la vitamina C y la melatonina (Ayala y col., 2014; Chang y col., 2008), que pueden evitar las alteraciones provocadas por el estrés oxidativo como la peroxidación de los lípidos de la membrana y la oxidación de la mitocondria y del ADN nuclear. Para comprobar la acción de los antioxidantes sobre las neuronas piramidales objeto de nuestro estudio hemos utilizado la melatonina ya que se ha demostrado que tiene una mayor capacidad protectora frente al daño oxidativo y secuestrando radicales libres que otros compuestos como la vitamina C o E (Galano y col., 2011; Pandi-Perumal y col., 2013). También hay que tener en cuenta los numerosos datos experimentales y clínicos que ponen de manifiesto la capacidad de la melatonina como antioxidante y potente antiinflamatorio que se distribuye por todo el organismo y lo defiende del estrés oxidativo (Acuña-Castroviejo y col., 2009). Estas dos propiedades son la base de los efectos beneficiosos observados en varios modelos de neurodegeneración. Por otra parte, la melatonina tiene un importante papel como antiapoptótico en numerosos modelos experimentales (Sainz y col., 2003) y como antiexcitotóxico ya que, según los datos que aportan Escames y colaboradores, tiene un efecto estimulador sobre la transmisión GABAérgica y un efecto inhibitor sobre la transmisión glutamatérgica lo que inhibe la respuesta de los receptores N-metil-D-aspartato o NMDA (Escames y col., 2004). Además, como la melatonina es un antioxidante endógeno directo, e induce los sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos, no presenta aspectos negativos al administrarse en humanos. A altas dosis es completamente adecuada para realizar ensayos

clínicos de neuroprotección en pacientes de ELA y no presenta efectos secundarios ya que tiene una vida media bastante corta (unos 30 minutos) (Pandi-Perumal y col., 2012; Acuña-Castroviejo y col., 2009; Weishaupt y col., 2006).

Nuestros datos muestran que la administración de melatonina junto con HC 10 μ M previene la LPO provocada por este último. Estos datos concuerdan completamente con los obtenidos por Muñoz y col., (2017) en experimentos con preparaciones in vivo. En este artículo se produce un incremento de peróxidos lipídicos en la glándula pineal cuando ésta se trata con HC y se demuestra que este incremento se previene completamente cuando se co-administra con melatonina. Los autores concluyen que la co-administración de HC con melatonina hace que esta última prevenga el incremento en la LPO (Muñoz y col., 2017). Por su parte, los resultados obtenidos por Weishaupt y colaboradores (2006) muestran que la melatonina atenúa la muerte celular provocada por glutamato en cultivos celulares. En ratones transgénicos SOD1-G93A, altas dosis de melatonina oral retrasan la progresión de la enfermedad y aumenta la supervivencia. Conocidos estos datos, los autores realizaron un ensayo clínico con 31 pacientes de ELA esporádica a los que administraron de manera crónica (2 años) altas dosis de melatonina vía rectal (300 mg/día). En estos pacientes los carbonilos circulantes de proteínas séricas, los cuales ejercen de marcador de estrés oxidativo, se encuentran elevados y sus niveles se normalizaron tras el tratamiento con melatonina (Weishaupt y col., 2006). Dada la baja reversibilidad que se ha observado de los efectos causados por el estrés oxidativo, cuando este estrés se mantiene en el tiempo, proponemos que los agentes neuroprotectores deben ser administrados antes de que las propiedades de membrana de las neuronas comiencen a sufrir cambios. Nuestros resultados también demuestran que la melatonina previene la LPO en periodos de tiempo muy cortos, pero solo de forma parcial a tiempos más largos. De ahí que deban ensayarse otras concentraciones y cocteles de antioxidantes y neuroprotectores que eviten la LPO al completo y de forma mantenida en el tiempo, como paso previo a su ensayo en clínica con pacientes ELA.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El HC despolarizó de forma progresiva el potencial de membrana de las neuronas piramidales de la corteza motora. Esta despolarización se acompañó de un decremento en el voltaje de despolarización, sin cambios en el voltaje umbral.
2. El HC modificó la resistencia de las neuronas de la corteza motora. Así, este parámetro aumentó tras 5 minutos de aplicación del oxidante para posteriormente disminuir por debajo de los valores iniciales a los 15 y 30 minutos. En paralelo, y comportándose como una membrana óhmica, los cambios en resistencia produjeron, a su vez, cambios compensatorios en la reobase.
3. La amplitud y duración del potencial de acción, disminuyó y aumentó, respectivamente, de forma progresiva tras el tratamiento con HC. Como consecuencia de la exposición al oxidante algunas células perdieron la capacidad de disparar potenciales de acción de forma repetitiva y aquellas que fueron capaces de mantener el disparo presentaron una disminución en la ganancia y frecuencia máxima.
4. Los efectos del HC sobre las propiedades de membrana son tiempo y dosis dependientes. Las propiedades activas son más sensibles al estrés oxidativo pudiéndose éstas afectar incluso con una exposición de 1 μ M.
5. El HC produjo una corriente tónica de entrada, independiente de transmisión sináptica, en las neuronas piramidales de la corteza motora. Esta corriente de entrada parece ser la razón de la despolarización del potencial de membrana que se observa en estas neuronas piramidales.
6. El HC produjo una depresión sobre las entradas sinápticas de las neuronas de la corteza motora que se vio reflejada en la disminución, tanto en frecuencia como en amplitud, de las corrientes postsinápticas tanto excitadoras como inhibitorias. No obstante, el efecto sobre la transmisión GABAérgica fue más rápido.
7. Las neuronas piramidales de la corteza motora mostraron una corriente tónica dependiente de receptores GABA_A. La abolición de esta corriente tónica por HC es la responsable de la hiperexcitabilidad, caracterizada por incremento de resistencia y disminución de reobase, encontrada en estas neuronas inmediatamente después del tratamiento con el oxidante.

8. La reversibilidad de las alteraciones de las propiedades de membrana producidas por el HC es inversamente proporcional al tiempo de exposición del oxidante, es decir, cuanto mayor es la exposición menor es la capacidad de reversión.
9. El HC realizó gran parte de sus efectos vía LPO. La preincubación del tejido nervioso con melatonina previno la LPO y las alteraciones funcionales causadas por el estrés oxidativo en las neuronas piramidales de la corteza motora.
10. El estrés oxidativo, en gran parte a través de la LPO, compromete la excitabilidad neuronal a través de mecanismos pre y postsinápticos, siendo las neuronas más afectadas las de mayor tamaño. Estas alteraciones funcionales producidas por el estrés oxidativo podrían preceder a la muerte neuronal encontrada en la ELA. El uso de sustancias antioxidantes como la melatonina puede abrir nuevas vías para el diseño de estrategias de neuroprotección en esta patología.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- AbouAssi, H., Connelly, M.A., Bateman, L.A., Tune, K.N., Huebner, J.L., Kraus, V.B., Winegar, D.A., Otvos, J.D., Kraus, W.E., Huffman, K.M., 2017. Does a lack of physical activity explain the rheumatoid arthritis lipid profile? *Lipids Health Dis.* 16, 39. doi:10.1186/s12944-017-0427-4
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Lopez, L., Ortiz, F., 2009. Evidencias de la utilidad de la melatonina frente al envejecimiento y los procesos neurodegenerativos. *Psicogeriatría* 1, 3-21.
- Ademowo, O.S., Dias, H.K.I., Burton, D.G.A., Griffiths, H.R., 2017. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? *Biogerontology*. doi:10.1007/s10522-017-9710-z
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aguilera, G., Colín-González, A.L., Rangel-López, E., Chavarría, A., Santamaría, A., 2017. Redox Signaling, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal. ars*.2017.7099. doi:10.1089/ars.2017.7099
- Ajrout-Driss, S., Siddique, T., 2015. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 679–684. doi:10.1016/j.bbadis.2014.08.010
- Alaverdashvili, M., Whishaw, I.Q., 2008. Motor cortex stroke impairs individual digit movement in skilled reaching by the rat. *Eur. J. Neurosci.* 28, 311–322. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06315.x
- Andersen, J.K., 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, S18–S25. doi:10.1038/nrn1434
- Angelova, P., Müller, W., 2006. Oxidative modulation of the transient potassium current I_A by intracellular arachidonic acid in rat CA1 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2375–2384. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04767.x
- Argüelles, S., Cano, M., Machado, A., Ayala, A., 2011. Effect of aging and oxidative stress on elongation factor-2 in hypothalamus and hypophysis. *Mech. Ageing Dev.* 132, 55–64. doi:10.1016/j.mad.2010.12.002
- Arrigo, A.P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 936–944.
- Asanuma, H., 1981. Functional role of sensory inputs to the motor cortex. *Prog. Neurobiol.* 16, 241–262.
- Asha Devi, S., 2009. Aging brain: prevention of oxidative stress by vitamin E and exercise. *ScientificWorldJournal.* 9, 366–372. doi:10.1100/tsw.2009.46
- Aufschnaiter, A., Kohler, V., Diessl, J., Peselj, C., Carmona-Gutierrez, D., Keller, W., Büttner, S., 2017. Mitochondrial lipids in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* 367, 125–140. doi:10.1007/s00441-016-2463-1
- Avossa, D., Grandolfo, M., Mazzarol, F., Zatta, M., Ballerini, L., 2006. Early signs of motoneuron vulnerability in a disease model system: Characterization of transverse slice cultures of spinal cord isolated from embryonic ALS mice. *Neuroscience* 138, 1179–1194. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.009
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and

- Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1–31. doi:10.1155/2014/360438
- Azbill, R.D., Mu, X., Springer, J.E., 2000. Riluzole increases high-affinity glutamate uptake in rat spinal cord synaptosomes. *Brain Res.* 871, 175–180.
- Bae, J.S., Simon, N.G., Menon, P., Vucic, S., Kiernan, M.C., 2013. The Puzzling Case of Hyperexcitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Clin. Neurol.* 9, 65. doi:10.3988/jcn.2013.9.2.65
- Bailey-Wilson, J.E., Plato, C.C., Elston, R.C., Garruto, R.M., 1993. Potential role of an additive genetic component in the cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the western Pacific. *Am. J. Med. Genet.* 45,68-76.
- Barber, S.C., Shaw, P.J., 2010. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 629–641. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018
- Batista-Brito, R., Fishell, G., 2009. Chapter 3 The Developmental Integration of Cortical Interneurons into a Functional Network, in: *Current Topics in Developmental Biology*. pp. 81–118. doi:10.1016/S0070-2153(09)01203-4
- Battistoni, A., Folcarelli, S., Cervoni, L., Polizio, F., Desideri, A., Giartosio, A., Rotilio, G., 1998. Role of the dimeric structure in Cu,Zn superoxide dismutase. pH-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273, 5655–5661.
- Bayliss, D.A., Talley, E.M., Sirois, J.E., Lei, Q., 2001. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive “leak” K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir. Physiol.* 129, 159–174.
- Bedard, K., Krause, K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Benigni, M., Ricci, C., Jones, A.R., Giannini, F., Al-Chalabi, A., Battistini, S., 2016. Identification of miRNAs as Potential Biomarkers in Cerebrospinal Fluid from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med.* 18, 551–560. doi:10.1007/s12017-016-8396-8
- Bhat, A.H., Dar, K.B., Anees, S., Zargar, M.A., Masood, A., Sofi, M.A., Ganie, S.A., 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed. Pharmacother.* 74, 101–110. doi:10.1016/j.biopha.2015.07.025
- Biane, J.S., Scanziani, M., Tuszynski, M.H., Conner, J.M., 2015. Motor Cortex Maturation Is Associated with Reductions in Recurrent Connectivity among Functional Subpopulations and Increases in Intrinsic Excitability. *J. Neurosci.* 35, 4719–4728. doi:10.1523/JNEUROSCI.2792-14.2015
- Bindoli, A., 1988. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 5, 247–261.
- Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., Lackner, K.J., AtheroGene Investigators, 2003. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 349, 1605–1613. doi:10.1056/NEJMoa030535
- Bogaert, E., d’Ydewalle, C., Van Den Bosch, L., 2010. Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 297–304.

- Bogdanov, M., Brown, R.H., Matson, W., Smart, R., Hayden, D., O'Donnell, H., Flint Beal, M., Cudkowicz, M., 2000. Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 652–658.
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., Cleveland, D.W., 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389–1392. doi:10.1126/science.1123511
- Bozzo, F., Mirra, A., Carri, M.T., 2017. Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: New perspectives. *Neurosci. Lett.* 636, 3–8. doi:10.1016/j.neulet.2016.04.065
- Brodmann, K., 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues (Barth, Leipzig). English translation available in Garey, L., 1994. Brodmann's "localisation in the cerebral cortex" (Smith Gordon, London).
- Burgos, K., Malenica, I., Metpally, R., Courtright, A., Rakela, B., Beach, T., Shill, H., Adler, C., Sabbagh, M., Villa, S., Tembe, W., Craig, D., Van Keuren-Jensen, K., 2014. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS One* 9, e94839. doi:10.1371/journal.pone.0094839
- Caballero-Hernandez, D., Toscano, M.G., Cejudo-Guillen, M., Garcia-Martin, M.L., Lopez, S., Franco, J.M., Quintana, F.J., Roodveldt, C., Pozo, D., 2016. The "Omics" of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Trends Mol. Med.* 22, 53–67. doi:10.1016/j.molmed.2015.11.001
- Cabungcal, J.H., Counotte, D.S., Lewis, E., Tejeda, H.A., Piantadosi, P., Pollock, C., Calhoon, G.G., Sullivan, E., Presgraves, E., Kil, J., Hong, L.E., Cuenod, M., Do, K.Q., O'Donnell, P., 2014. Juvenile antioxidant treatment prevents adult deficits in a developmental model of schizophrenia. *Neuron* 83, 1073–1084. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.028
- Cai, J., Chen, J., He, H., Yin, Z., Zhu, Z., Yin, D., 2009. Carbonyl stress: malondialdehyde induces damage on rat hippocampal neurons by disturbance of Ca(2+) homeostasis. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 435–445. doi:10.1007/s10565-008-9097-3
- Camacho, A., Esteban, J., Paradas, C., 2015. Report by the Spanish Foundation for the Brain on the social impact of amyotrophic lateral sclerosis and other neuromuscular disorders. *Neurologia*. doi:10.1016/j.nrl.2015.02.003
- Carrascal, L., Nieto-Gonzalez, J.L., Núñez-Abades, P., Torres, B., 2006. Temporal sequence of changes in electrophysiological properties of oculomotor motoneurons during postnatal development. *Neuroscience* 140, 1223–1237. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.03.006
- Carri, M.T., Ferri, A., Cozzolino, M., Calabrese, L., Rotilio, G., 2003. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res. Bull.* 61, 365–374.
- Carri, M.T., Valle, C., Bozzo, F., Cozzolino, M., 2015. Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 41. doi:10.3389/fncel.2015.00041
- Casareno, R.L., Waggoner, D., Gitlin, J.D., 1998. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 273, 23625–23628.
- Chagnac-Amitai, Y., Luhmann, H.J., Prince, D.A., 1990. Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *J. Comp. Neurol.* 296, 598–613. doi:10.1002/cne.902960407

- Chang, H.M., Huang, Y.L., Lan, C.T., Wu, U.I., Hu, M.E., Youn, S.C., 2008. Melatonin preserves superoxide dismutase activity in hypoglossal motoneurons of adult rats following peripheral nerve injury. *J. Pineal Res.* 44, 172–180. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00505.x
- Charcot, J., Joffroy, A., 1869. Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.* 2, 744-754.
- Christophe, E., Doerflinger, N., Lavery, D.J., Molnár, Z., Charpak, S., Audinat, E., 2005. Two populations of layer v pyramidal cells of the mouse neocortex: development and sensitivity to anesthetics. *J. Neurophysiol.* 94, 3357–3367. doi:10.1152/jn.00076.2005
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806–819. doi:10.1038/35097565
- Cordeiro, R.M., 2014. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 438–444. doi:10.1016/j.bbamem.2013.09.016
- Costa, J., Swash, M., de Carvalho, M., 2012. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch. Neurol.* 69, 1410–1416. doi:10.1001/archneurol.2012.254
- Davies, M.J., 2003. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 761–770.
- de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., Swash, M., 2008. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin. Neurophysiol.* 119, 497–503. doi:10.1016/j.clinph.2007.09.143
- DeFelipe, J., Fariñas, I., 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* 39, 563–607.
- DeFelipe, J., López-Cruz, P.L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T.F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P.R., Huang, J., Jones, E.G., Kawaguchi, Y., Kisvárdy, Z., Kubota, Y., Lewis, D.A., Marín, O., Markram, H., McBain, C.J., Meyer, H.S., Monyer, H., Nelson, S.B., Rockland, K., Rossier, J., Rubenstein, J.L.R., Rudy, B., Scanziani, M., Shepherd, G.M., Sherwood, C.C., Staiger, J.F., Tamás, G., Thomson, A., Wang, Y., Yuste, R., Ascoli, G.A., 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 202–216. doi:10.1038/nrn3444
- Del Castillo, J., 1997. Electrophysiology in the 19th century. *P. R. Health Sci. J.* 16, 417–427.
- Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G.H., Donkervoort, S., Bigio, E.H., Brooks, B.R., Ajroud, K., Sufit, R.L., Haines, J.L., Mugnaini, E., Pericak-Vance, M.A., Siddique, T., 2011. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211–215. doi:10.1038/nature10353
- Deng, H., Gao, K., Jankovic, J., 2014. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 337–348. doi:10.1038/nrneurol.2014.78
- Denk, J., Boelmans, K., Siegmund, C., Lassner, D., Arlt, S., Jahn, H., 2015. MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer's Disease. *PLoS One* 10, e0126423. doi:10.1371/journal.pone.0126423
- Do-Ha, D., Buskila, Y., Ooi, L., 2017. Impairments in Motor Neurons, Interneurons and Astrocytes

- Contribute to Hyperexcitability in ALS: Underlying Mechanisms and Paths to Therapy. *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-017-0392-y
- Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R.A., Capell, A., Schmid, B., Neumann, M., Haass, C., 2010. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* 29, 2841–2857. doi:10.1038/emboj.2010.143
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkentin, J.D., Gunn-Moore, F.J., Vonsattel, J.P., Arancio, O., Chen, J.X., Yan, S. Du, 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 14, 1097–1105. doi:10.1038/nm.1868
- Dum, R.P., Strick, P.L., 2005. Frontal lobe inputs to the digit representations of the motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J. Neurosci.* 25, 1375–1386. doi:10.1523/JNEUROSCI.3902-04.2005
- Dunlop, J., Beal Mcllvain, H., She, Y., Howland, D.S., 2003. Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 23, 1688–1696.
- Dupuis, L., Pradat, P.F., Ludolph, A.C., Loeffler, J.P., 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 10,75-82. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70224-6.
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.J., Lacomblez, L., Loeffler, J.P., Meininger, V., 2008. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70,1004-1009. doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.
- Dupuis, L., Oudart, H., René, F., Gonzalez de Aguilar, J.L., Loeffler, J.P., 2004. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101,11159-11164.
- Eccles, J.C., 1981. The modular operation of the cerebral neocortex considered as the material basis of mental events. *Neuroscience* 6, 1839–1856.
- Eisen, A., Weber, M., 2000. Neurophysiological evaluation of cortical function in the early diagnosis of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 1 Suppl 1, S47-S51.
- Elston, G.N., DeFelipe, J., 2002. Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species. *Prog. Brain Res.* 136, 109–133.
- Elustondo, P., Martin, L.A., Karten, B., 2017. Mitochondrial cholesterol import. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 90–101. doi:10.1016/j.bbalip.2016.08.012
- Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* 58, 39–46.
- Escames, G., Acuña-Castroviejo, D.A., 2009. Melatonina, análogos sintéticos y el ritmo sueño/vigilia. *Rev Neurol.* 48, 245-254.
- Escames, G., León, J., López, L.C., Acuña-Castroviejo, D., 2004. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J. Neuroendocrinol.* 16, 929–935. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01250.x
- Feldman, S.C., Kastin, A.J., 1984. The distribution of neurons containing delta sleep-inducing peptide in the hippocampal formation. *Brain Res. Bull.* 13, 833–837.

- Fernández, E., 2015. Peroxidation and Halogenation Stress: Windows to a Better Understanding of Sporadic Parkinson's Disease. *Austin J. Clin. Neurol.* 2, 1082-1089.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., 2011. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 311, 92–97. doi:10.1016/j.jns.2011.09.004
- Fisher, N.D., Nistri, A., 1993. Substance P and TRH share a common effector pathway in rat spinal motoneurons: an in vitro electrophysiological investigation. *Neurosci. Lett.* 153, 115–119.
- Foerster, B.R., Callaghan, B.C., Petrou, M., Edden, R.A.E., Chenevert, T.L., Feldman, E.L., 2012. Decreased motor cortex γ -aminobutyric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 78, 1596–1600. doi:10.1212/WNL.0b013e3182563b57
- Fogarty, M.J., Klenowski, P.M., Lee, J.D., Driberg-Thompson, J.R., Bartlett, S.E., Ngo, S.T., Hilliard, M.A., Bellingham, M.C., Noakes, P.G., 2016. Cortical synaptic and dendritic spine abnormalities in a presymptomatic TDP-43 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* 6, 37968. doi:10.1038/srep37968
- Fogarty, M.J., Noakes, P.G., Bellingham, M.C., 2015. Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 35, 643–647. doi:10.1523/JNEUROSCI.3483-14.2015
- Foran, E., Trotti, D., 2009. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1587–602. doi:10.1089/ars.2009.2444
- Frantseva, M. V, Perez Velazquez, J.L., Carlen, P.L., 1998. Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. *J. Neurophysiol.* 80, 1317–1326.
- Fritz, K.S., Petersen, D.R., 2013. An overview of the chemistry and biology of reactive aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 59, 85–91. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.025
- Fulton, J.F., 1939. Physiology of the nervous system. *Science* 90, 110. doi:10.1126/science.90.2327.110
- Galano, A., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J. Pineal Res.* 51, 1–16. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00916.x
- Gallego, J.A., Gordon, M.L., Claycomb, K., Bhatt, M., Lencz, T., Malhotra, A.K., 2012. In vivo microRNA detection and quantitation in cerebrospinal fluid. *J. Mol. Neurosci.* 47, 243–248. doi:10.1007/s12031-012-9731-7
- Ganie, S.A., Dar, T.A., Bhat, A.H., Dar, K.B., Anees, S., Zargar, M.A., Masood, A., 2016. Melatonin: A Potential Anti-Oxidant Therapeutic Agent for Mitochondrial Dysfunctions and Related Disorders. *Rejuvenation Res.* 19, 21–40. doi:10.1089/rej.2015.1704
- Gao, J., Wang, L., Liu, J., Xie, F., Su, B., Wang, X., 2017. Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants* 6, 25. doi:10.3390/antiox6020025
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 419–425. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086
- Gasser, T., 2007. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22 Suppl 17, S343-S350. doi:10.1002/mds.21676

- Geevasinga, N., Menon, P., Yiannikas, C., Kiernan, M.C., Vucic, S., 2014. Diagnostic utility of cortical excitability studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 21, 1451–1457. doi:10.1111/ene.12422
- Gogvadze, V.G., Zhukova, A.A., 1991. The role of lipid peroxidation products in cumene hydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from mitochondria. *FEBS Lett.* 287, 139–141.
- Goldhaber, J.I., Ji, S., Lamp, S.T., Weiss, J.N., 1989. Effects of exogenous free radicals on electromechanical function and metabolism in isolated rabbit and guinea pig ventricle. Implications for ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 83, 1800–1809. doi:10.1172/JCI114085
- Goldhaber, J.I., Liu, E., 1994. Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. *J. Physiol.* 477, 135–147.
- Golgi, C., 1886. *Sur l'anatomie microscopique des organes centraux du système nerveux*. Hoepli, Milano.
- Golgi, C., 1873. On the structure of the brain grey matter. *Gazz. Medica Ital. Lomb.* 33, 244–246.
- González, A., Schmid, A., Salido, G.M., Camello, P.J., Pariente, J.A., 2002. XOD-catalyzed ROS generation mobilizes calcium from intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells. *Cell. Signal.* 14, 153–159.
- Gracanin, M., Hawkins, C.L., Pattison, D.I., Davies, M.J., 2009. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 92–102. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.015
- Grosskreutz, J., Haastert, K., Dewil, M., Van Damme, P., Callewaert, G., Robberecht, W., Dengler, R., Van Den Bosch, L., 2007. Role of mitochondria in kainate-induced fast Ca^{2+} transients in cultured spinal motor neurons. *Cell Calcium* 42, 59–69. doi:10.1016/j.ceca.2006.11.010
- Guatteo, E., Carunchio, I., Pieri, M., Albo, F., Canu, N., Mercuri, N.B., Zona, C., 2007. Altered calcium homeostasis in motor neurons following AMPA receptor but not voltage-dependent calcium channels' activation in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 28, 90–100. doi:10.1016/j.nbd.2007.07.002
- Guiroy, D.C., Miyazaki, M., Multhaup, G., Fischer, P., Garruto, R.M., Beyreuther, K., Masters, C.L., Simms, G., Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., 1987. Amyloid of neurofibrillary tangles of Guamanian parkinsonism-dementia and Alzheimer disease share identical amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 2073–2077.
- Hadzhieva, M., Kirches, E., Wilisch-Neumann, A., Pachow, D., Wallesch, M., Schoenfeld, P., Paegge, I., Vielhaber, S., Petri, S., Keilhoff, G., Mawrin, C., 2013. Dysregulation of iron protein expression in the G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 230, 94–101. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.11.021
- Haghikia, A., Haghikia, A., Hellwig, K., Baraniskin, A., Holzmann, A., Décard, B.F., Thum, T., Gold, R., 2012. Regulated microRNAs in the CSF of patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology* 79, 2166–2170. doi:10.1212/WNL.0b013e3182759621
- Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685–716.
- Hallman, L.E., Schofield, B.R., Lin, C.S., 1988. Dendritic morphology and axon collaterals of corticotectal, corticopontine, and callosal neurons in layer V of primary visual cortex of the hooded rat. *J. Comp. Neurol.* 272, 149–160. doi:10.1002/cne.902720111

- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.
- Han, J., Ma, L., 2010. Study of the features of proton MR spectroscopy ((1)H-MRS) on amyotrophic lateral sclerosis. *J. Magn. Reson. Imaging* 31, 305–308. doi:10.1002/jmri.22053
- Hardeland, R., 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2001–2018. doi:10.1007/s00018-008-8001-x
- Hasan, S.M.K., Redzic, Z.B., Alshuaib, W.B., 2013. Hydrogen peroxide-induced reduction of delayed rectifier potassium current in hippocampal neurons involves oxidation of sulfhydryl groups. *Brain Res.* 1520, 61–69. doi:10.1016/j.brainres.2013.05.019
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L., Masliah, E., 2003. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. *Neuromolecular Med.* 4, 21–36. doi:10.1385/NMM:4:1-2:21
- Heath, P.R., Shaw, P.J., 2002. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26, 438–458. doi:10.1002/mus.10186
- Helkin, A., Stein, J.J., Lin, S., Siddiqui, S., Maier, K.G., Gahtan, V., 2016. Dyslipidemia Part 1--Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc. Endovascular Surg.* 50, 107–118. doi:10.1177/1538574416628654
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseon, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C.A., Breitner, J.C., Cole, G.M., Golenbock, D.T., Kummer, M.P., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Lancet. Neurol.* 14, 388–405. doi:10.1016/S1474-4422(15)70016-5
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Latz, E., 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477. doi:10.1038/nri3705
- Hermida-Ameijeiras, A., Méndez-Alvarez, E., Sánchez-Iglesias, S., Sanmartín-Suárez, C., Soto-Otero, R., 2004. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem. Int.* 45, 103–116. doi:10.1016/j.neuint.2003.11.018
- Hille, B., 1992. Axons, ions, and dons. *Science* 258, 144–145. doi:10.1126/science.258.5079.144
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A.D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci.* 21, 3017–3023.
- Hool, L.C., 2006. Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 146–151. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04341.x
- Hosp, J.A., Pekanovic, A., Rioult-Pedotti, M.S., Luft, A.R., 2011. Dopaminergic projections from midbrain to primary motor cortex mediate motor skill learning. *J. Neurosci.* 31, 2481–2487. doi:10.1523/JNEUROSCI.5411-10.2011

- Huang, W.F., Ouyang, S., Zhang, H., 2009. The characteristics and oxidative modulation of large-conductance calcium-activated potassium channels in guinea-pig colon smooth muscle cells. *Sheng Li Xue Bao* 61, 285–291.
- Huerta, M.F., Pons, T.P., 1990. Primary motor cortex receives input from area 3a in macaques. *Brain Res.* 537, 367–371.
- Ikawa, M., Okazawa, H., Tsujikawa, T., Matsunaga, A., Yamamura, O., Mori, T., Hamano, T., Kiyono, Y., Nakamoto, Y., Yoneda, M., 2015. Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. *Neurology* 84, 2033–2039. doi:10.1212/WNL.0000000000001588
- Islam, M.T., 2017. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* 39, 73–82. doi:10.1080/01616412.2016.1251711
- Israelson, A., Arbel, N., Da Cruz, S., Ilieva, H., Yamanaka, K., Shoshan-Barmatz, V., Cleveland, D.W., 2010. Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron* 67, 575–587. doi:10.1016/j.neuron.2010.07.019
- Jacob, S., Poeggeler, B., Weishaupt, J.H., Sirén, A.-L., Hardeland, R., Bähr, M., Ehrenreich, H., 2002. Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): high tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J. Pineal Res.* 33, 186–187.
- Jaiswal, M.K., 2016. Riluzole But Not Melatonin Ameliorates Acute Motor Neuron Degeneration and Moderately Inhibits SOD1-Mediated Excitotoxicity Induced Disrupted Mitochondrial Ca(2+) Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 295. doi:10.3389/fncel.2016.00295
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856.
- Jimenez-Jorge, S., Guerrero, J.M., Jimenez-Caliani, A.J., Naranjo, M.C., Lardone, P.J., Carrillo-Vico, A., Osuna, C., Molinero, P., 2007. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J. Pineal Res.* 42, 240–246. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00411.x
- Jovanovic, Z., Jovanovic, S., 2013. Comparison of the effects of cumene hydroperoxide and hydrogen peroxide on Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Exp. Anim.* 62, 9–17.
- Jovanovic, Z.D., Stanojevic, M.B., Nedeljkov, V.B., 2016. The neurotoxic effects of hydrogen peroxide and copper in Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Biol. Open* 5, 381–388. doi:10.1242/bio.014936
- Kasper, E.M., Lübke, J., Larkman, A.U., Blakemore, C., 1994. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. III. Differential maturation of axon targeting, dendritic morphology, and electrophysiological properties. *J. Comp. Neurol.* 339, 495–518. doi:10.1002/cne.903390404
- Kepecs, A., Fishell, G., 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505, 318–326. doi:10.1038/nature12983
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., Zoing, M.C., 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)* 377, 942–955. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7

- Kim, C., Lee, H.C., Sung, J.J., 2014. Amyotrophic lateral sclerosis - cell based therapy and novel therapeutic development. *Exp. Neurobiol.* 23, 207–214. doi:10.5607/en.2014.23.3.207
- King, A.E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M.T.K., Vickers, J.C., 2016. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp. Neurol.* 275, 162–171. doi:10.1016/j.expneurol.2015.09.019
- Koch, B.C.P., Nagtegaal, J.E., Kerkhof, G.A., ter Wee, P.M., 2009. Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 5, 407–416. doi:10.1038/nrneph.2009.88
- Kolb, B., Gorny, G., Li, Y., Samaha, A.-N., Robinson, T.E., 2003. Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10523–8. doi:10.1073/pnas.1834271100
- Kourie, J.I., 1998. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am. J. Physiol.* 275, C1-C24.
- Krag, S.S., 2011. Special Issue: human and murine redox protein atlases. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 1. doi:10.1016/j.bbagen.2010.11.003
- Kuo, J.J., Schonewille, M., Siddique, T., Schults, A.N.A., Fu, R., Bär, P.R., Anelli, R., Heckman, C.J., Kroese, A.B.A., 2004. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J. Neurophysiol.* 91, 571–575. doi:10.1152/jn.00665.2003
- Kuo, J.J., Siddique, T., Fu, R., Heckman, C.J., 2005. Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J. Physiol.* 563, 843–854. doi:10.1113/jphysiol.2004.074138
- Kuypers, H.G., 1987. Some aspects of the organization of the output of the motor cortex. *Ciba Found. Symp.* 132, 63–82.
- Kwak, S., Hideyama, T., Yamashita, T., Aizawa, H., 2010. AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30, 182–188. doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x
- Lamanauskas, N., Nistri, A., 2008. Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2501–2514. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06211.x
- Larkman, A., Mason, A., 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. I. Establishment of cell classes. *J. Neurosci.* 10, 1407–1414.
- Leszek, J., Barreto, G.E., Gąsiorowski, K., Koutsouraki, E., Ávila-Rodrigues, M., Aliev, G., 2016. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 15, 329–336.
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.-G., Ghanbari, H.A., 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 24438–24475. doi:10.3390/ijms141224438
- Linster, C.L., Van Schaftingen, E., 2007. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 274, 1–22. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x
- Ljubisavljevic, S., 2016. Oxidative Stress and Neurobiology of Demyelination. *Mol. Neurobiol.* 53, 744–758. doi:10.1007/s12035-014-9041-x

- Lloyd, C.M., Richardson, M.P., Brooks, D.J., Al-Chalabi, A., Leigh, P.N., 2000. Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA(A) ligand [(11)C]flumazenil. *Brain* 2289–2296.
- Lorente de Nó, R., 1947. A study of nerve physiology. *Stud. Rockefeller Inst. Med. Res. Repr.* 131, 1–496.
- Madsen, M.T., Isbrand, A., Andersen, U.O., Andersen, L.J., Taskiran, M., Simonsen, E., Gögenur, I., 2017. The effect of MELatonin on Depressive symptoms, Anxiety, Clrcadian and Sleep disturbances in patients after acute coronary syndrome (MEDACIS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 18, 81. doi:10.1186/s13063-017-1806-x
- Maekawa, S., Al-Sarraj, S., Kibble, M., Landau, S., Parnavelas, J., Cotter, D., Everall, I., Leigh, P.N., 2004. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain* 127, 1237–1251. doi:10.1093/brain/awh132
- Malessa, S., Leigh, P.N., Bertel, O., Sluga, E., Hornykiewicz, O., 1991. Amyotrophic lateral sclerosis: glutamate dehydrogenase and transmitter amino acids in the spinal cord. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 54, 984–988.
- Marin, B., Desport, J.C., Kajeu, P., Jesus, P., Nicolaud, B., Nicol, M., Preux, P.M., Couratier, P., 2011. Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 82,628-634. doi: 10.1136/jnnp.2010.211474.
- Martin, H.L., Teismann, P., 2009. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 23, 3263–3272. doi:10.1096/fj.08-125443
- Martin, L.J., Chang, Q., 2012. Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurobiol.* 45, 30–42. doi:10.1007/s12035-011-8217-x
- Martin, S., Al Khleifat, A., Al-Chalabi, A., 2017. What causes amyotrophic lateral sclerosis? *F1000Research* 6, 371. doi:10.12688/f1000research.10476.1
- Martorana, F., Brambilla, L., Valori, C.F., Bergamaschi, C., Roncoroni, C., Aronica, E., Volterra, A., Bezzi, P., Rossi, D., 2012. The BH4 domain of Bcl-XL rescues astrocyte degeneration in amyotrophic lateral sclerosis by modulating intracellular calcium signals. *Hum. Mol. Genet.* 21, 826–840. doi:10.1093/hmg/ddr513
- Mason, A., Larkman, A., 1990. Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J. Neurosci.* 10, 1415–1428.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595–603.
- Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P., Le Masson, G., 2017. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen. Res.* 12, 181–184. doi:10.4103/1673-5374.200794
- Mauerhofer, C., Philippova, M., Oskolkova, O. V, Bochkov, V.N., 2016. Hormetic and anti-inflammatory properties of oxidized phospholipids. *Mol. Aspects Med.* 49, 78–90. doi:10.1016/j.mam.2016.02.003
- McGown, A., McDearmid, J.R., Panagiotaki, N., Tong, H., Al Mashhadi, S., Redhead, N., Lyon, A.N., Beattie, C.E., Shaw, P.J., Ramesh, T.M., 2013. Early interneuron dysfunction in ALS: insights

- from a mutant *sod1* zebrafish model. *Ann. Neurol.* 73, 246–258. doi:10.1002/ana.23780
- Mitchell, R.M., Freeman, W.M., Randazzo, W.T., Stephens, H.E., Beard, J.L., Simmons, Z., Connor, J.R., 2009. A CSF biomarker panel for identification of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 72, 14–19. doi:10.1212/01.wnl.0000333251.36681.a5
- Miyachi, S., Lu, X., Inoue, S., Iwasaki, T., Koike, S., Nambu, A., Takada, M., 2005. Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. *J. Neurosci.* 25, 2547–2556. doi:10.1523/JNEUROSCI.4186-04.2005
- Mochizuki, Y., Mizutani, T., Shimizu, T., Kawata, A., 2011. Proportional neuronal loss between the primary motor and sensory cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 503, 73–75. doi:10.1016/j.neulet.2011.08.014
- Molnár, Z., Cheung, A.F.P., 2006. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci. Res.* 55, 105–115. doi:10.1016/j.neures.2006.02.008
- Morecraft, R.J., Van Hoesen, G.W., 1993. Frontal granular cortex input to the cingulate (M3), supplementary (M2) and primary (M1) motor cortices in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 337, 669–689. doi:10.1002/cne.903370411
- Moser, J.M., Bigini, P., Schmitt-John, T., 2013. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol. Genet. Genomics* 288, 207–229. doi:10.1007/s00438-013-0741-0
- Muñoz, M.F., Argüelles, S., Cano, M., Marotta, F., Ayala, A., 2017. Aging and Oxidative Stress Decrease Pineal Elongation Factor 2: In Vivo Protective Effect of Melatonin in Young Rats Treated With Cumene Hydroperoxide. *J. Cell. Biochem.* 118, 182–190. doi:10.1002/jcb.25624
- Murata, Y., Higo, N., Hayashi, T., Nishimura, Y., Sugiyama, Y., Oishi, T., Tsukada, H., Isa, T., Onoe, H., 2015. Temporal plasticity involved in recovery from manual dexterity deficit after motor cortex lesion in macaque monkeys. *J. Neurosci.* 35, 84–95. doi:10.1523/JNEUROSCI.1737-14.2015
- Nakaya, H., Takeda, Y., Tohse, N., Kanno, M., 1992. Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 523–534.
- Nam, T.G., 2011. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicol. Res.* 27, 1–6. doi:10.5487/TR.2011.27.1.001
- Nani, F., Cifra, A., Nistri, A., 2010. Transient oxidative stress evokes early changes in the functional properties of neonatal rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 31, 951–966. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07108.x
- Navarro-Yepes, J., Zavala-Flores, L., Anandhan, A., Wang, F., Skotak, M., Chandra, N., Li, M., Pappa, A., Martinez-Fong, D., Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Franco, R., 2014. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. *Pharmacol. Ther.* 142, 206–230. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.007
- Ng, M.L., Wadham, C., Sukocheva, O.A., 2017. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies (Review). *Int. J. Mol. Med.* 39, 243–252. doi:10.3892/ijmm.2017.2855
- Niebroj-Dobosz, I., Janik, P., 1999. Amino acids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Acta Neurol. Scand.* 100, 6–11.
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., Filip, M., 2016.

- Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 4094–4125. doi:10.1007/s12035-015-9337-5
- Nieto-Gonzalez, J.L., Moser, J., Lauritzen, M., Schmitt-John, T., Jensen, K., 2011. Reduced GABAergic Inhibition Explains Cortical Hyperexcitability in the Wobbler Mouse Model of ALS. *Cereb. Cortex* 21, 625–635. doi:10.1093/cercor/bhq134
- Nihei, K., Kowall, N.W., 1993. Involvement of NPY-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 159, 67–70.
- Nordberg, J., Arnér, E.S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287–1312.
- Núñez-Abades, P.A., Pattillo, J.M., Hodgson, T.M., Cameron, W.E., 2000. Role of synaptic inputs in determining input resistance of developing brain stem motoneurons. *J. Neurophysiol.* 84, 2317–2329.
- Núñez-Abades, P.A., Spielmann, J.M., Barrionuevo, G., Cameron, W.E., 1993. In vitro electrophysiology of developing genioglossal motoneurons in the rat. *J. Neurophysiol.* 70, 1401–1411.
- Oh, J.M., Choi, E.K., Carp, R.I., Kim, Y.S., 2012. Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy* 8, 1448–1461. doi:10.4161/auto.21164
- Ohnishi, S., Takano, K., 2004. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 511–524. doi:10.1007/s00018-003-3264-8
- Oswald, M.J., Tantirigama, M.L.S., Sonntag, I., Hughes, S.M., Empson, R.M., 2013. Diversity of layer 5 projection neurons in the mouse motor cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 174. doi:10.3389/fncel.2013.00174
- Paiva, C.N., Bozza, M.T., 2014. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1000–1037. doi:10.1089/ars.2013.5447
- Pandi-Perumal, S.R., BaHammam, A.S., Brown, G.M., Spence, D.W., Bharti, V.K., Kaur, C., Hardeland, R., Cardinali, D.P., 2013. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox. Res.* 23, 267–300. doi:10.1007/s12640-012-9337-4
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273, 2813–2838. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x
- Parakh, S., Spencer, D.M., Halloran, M.A., Soo, K.Y., Atkin, J.D., 2013. Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 408681. doi:10.1155/2013/408681
- Pardillo-Díaz, R., Carrascal, L., Ayala, A., Nunez-Abades, P., 2015. Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. *Neuroscience* 289, 85–98. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.12.055
- Pardillo-Díaz, R., Carrascal, L., Barrionuevo, G., Nunez-Abades, P., 2017. Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide produces synaptic depression and transient hyperexcitability in rat primary motor cortex neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 82, 204–217. doi:10.1016/j.mcn.2017.06.002
- Pardillo-Díaz, R., Carrascal, L., Muñoz, M.F., Ayala, A., Nunez-Abades, P., 2016. Time and dose dependent effects of oxidative stress induced by cumene hydroperoxide in neuronal

- excitability of rat motor cortex neurons. *Neurotoxicology* 53, 201–214.
- Pardo, A.C., Wong, V., Benson, L.M., Dykes, M., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Maragakis, N.J., 2006. Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1(G93A) mice. *Exp. Neurol.* 201, 120–130. doi:10.1016/j.expneurol.2006.03.028
- Patel, B.P., Hamadeh, M.J., 2009. Nutritional and exercise-based interventions in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Nutr.* 28, 604–617. doi:10.1016/j.clnu.2009.06.002
- Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R.H., Nanche, N., Kia, A., Trotti, D., Pasinelli, P., 2010. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2974–2986. doi:10.1093/hmg/ddq202doi:10.1016/j.neuro.2016.02.005
- Pellmar, T.C., 1987. Peroxide alters neuronal excitability in the CA1 region of guinea-pig hippocampus in vitro. *Neuroscience* 23, 447–456.
- Peters, A.J., Liu, H., Komiyama, T., 2017. Learning in the Rodent Motor Cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, annurev-neuro-072116-031407. doi:10.1146/annurev-neuro-072116-031407
- Petri, S., Krampfl, K., Hashemi, F., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., Bufler, J., 2003. Distribution of GABAA receptor mRNA in the motor cortex of ALS patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1041–1051.
- Philips, T., Robberecht, W., 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* 10, 253–263. doi:10.1016/S1474-4422(11)70015-1
- Pieri, M., Caioli, S., Canu, N., Mercuri, N.B., Guatteo, E., Zona, C., 2013. Over-expression of N-type calcium channels in cortical neurons from a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Exp. Neurol.* 247, 349–358. doi:10.1016/j.expneurol.2012.11.002
- Pieri, M., Carunchio, I., Curcio, L., Mercuri, N.B., Zona, C., 2009. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 215, 368–379. doi:10.1016/j.expneurol.2008.11.002
- Pimienta, H., 2004. La corteza cerebral más allá de la corteza. *Rev. Colomb. Psiquiatr. Supl.* 33, 58–75.
- Pioro, E.P., Majors, A.W., Mitsumoto, H., Nelson, D.R., Ng, T.C., 1999. 1H-MRS evidence of neurodegeneration and excess glutamate + glutamine in ALS medulla. *Neurology* 53, 71–79.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499–1503.
- Popa-Wagner, A., Mitran, S., Sivanesan, S., Chang, E., Buga, A.M., 2013. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 963520. doi:10.1155/2013/963520
- Poppe, L., Rué, L., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., 2014. Translating biological findings into new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp. Neurol.* 262 Pt B, 138–151. doi:10.1016/j.expneurol.2014.07.001
- Pun, P.B.L., Lu, J., Mochhala, S., 2009. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic. Res.* 43, 348–364. doi:10.1080/10715760902751902
- Racay, P., Kaplán, P., Mézesová, V., Lehotský, J., 1997. Lipid peroxidation both inhibits Ca(2+)-ATPase and increases Ca2+ permeability of endoplasmic reticulum membrane. *Biochem.*

- Mol. Biol. Int. 41, 647–655.
- Ramón y Cajal, S., 1892. El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Rev. Ciencias Méd.* 18,457-476.
- Ramón y Cajal, S., 1899. Estudios sobre la corteza cerebral humana II: Estructura de la corteza motriz del hombre y mamíferos superiores. *Rev. Trim. Micrográf.* 4, 117-200.
- Ramón y Cajal, S., 1901. Estudios sobre la corteza cerebral humana IV. Estructura de la corteza olfativa del hombre y mamíferos. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid* 1,1-140.
- Ranson, S.W., Clark, S.L., 1959. *Anatomy of the Nervous System*, 10th ed. W. B. Saunders Co, Philadelphia.
- Rasmussen, T., Penfield, W., 1947. Further studies of the sensory and motor cerebral cortex of man. *Fed. Proc.* 6, 452–460.
- Reiter, R.J., 1994. Melatonin suppression by static and extremely low frequency electromagnetic fields: relationship to the reported increased incidence of cancer. *Rev. Environ. Health* 10, 171–186.
- Reynolds, A., Laurie, C., Lee Mosley, R., Gendelman, H.E., 2007. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders, in: *International Review of Neurobiology*. pp. 297–325. doi:10.1016/S0074-7742(07)82016-2
- Robinson, R.B., Siegelbaum, S.A., 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 453–480. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734
- Rothstein, J.D., Tsai, G., Kuncl, R.W., Clawson, L., Cornblath, D.R., Drachman, D.B., Pestronk, A., Stauch, B.L., Coyle, J.T., 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 28, 18–25. doi:10.1002/ana.410280106
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W., 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 73–84. doi:10.1002/ana.410380114
- Rowland, L.P., 2001. How amyotrophic lateral sclerosis got its name: the clinical-pathologic genius of Jean-Martin Charcot. *Arch. Neurol.* 58, 512–515.
- Ryberg, H., Bowser, R., 2008. Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev. Proteomics* 5, 249–262. doi:10.1586/14789450.5.2.249
- Saba, L., Viscomi, M.T., Caioli, S., Pignataro, A., Bisicchia, E., Pieri, M., Molinari, M., Ammassari-Teule, M., Zona, C., 2016. Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cereb. Cortex* 26, 1512–1528. doi:10.1093/cercor/bhu317
- Sainz, R.M., Mayo, J.C., Rodríguez, C., Tan, D.X., Lopez-Burillo, S., Reiter, R.J., 2003. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1407–1426. doi:10.1007/s00018-003-2319-1
- Salim, S., 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 360, 201–205. doi:10.1124/jpet.116.237503
- Salvador, A., Donderis, S., Olivares, C., Guaita, M., Espinosa, O., Rodríguez, J., Fondos, M., Sáez, G.T., 2003. El estrés oxidativo en la patología degenerativa. Mecanismos de acción y marcadores de lesión molecular. *Revista Química Clínica* 25,49-57.

- Sarlette, A., Krampfl, K., Grothe, C., Neuhoff, N. von, Dengler, R., Petri, S., 2008. Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1055–1062. doi:10.1097/NEN.0b013e31818b4906
- Sasabe, J., Aiso, S., 2010. Aberrant Control of Motoneuronal Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Excitatory Glutamate/D-Serine vs. Inhibitory Glycine/ γ -Aminobutanoic Acid (GABA). *Chem. Biodivers.* 7, 1479–1490. doi:10.1002/cbdv.200900306
- Schmitt-John, T., Drepper, C., Mussmann, A., Hahn, P., Kuhlmann, M., Thiel, C., Hafner, M., Lengeling, A., Heimann, P., Jones, J.M., Meisler, M.H., Jockusch, H., 2005. Mutation of Vps54 causes motor neuron disease and defective spermiogenesis in the wobbler mouse. *Nat. Genet.* 37, 1213–1215. doi:10.1038/ng1661
- Sebe, J.Y., Looke-Stewart, E.C., Estrada, R.C., Baraban, S.C., 2010. Robust tonic GABA currents can inhibit cell firing in mouse newborn neocortical pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1310–1318. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07373.x
- Sha, W., Martins, A.M., Laubenbacher, R., Mendes, P., Shulaev, V., 2013. The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PLoS One* 8, e74939. doi:10.1371/journal.pone.0074939
- Shelat, P.B., Chalimoniuk, M., Wang, J.-H., Strosznajder, J.B., Lee, J.C., Sun, A.Y., Simonyi, A., Sun, G.Y., 2008. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A₂ in cortical neurons. *J. Neurochem.* 106, 45–55. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05347.x
- Shimura, J., Shimura, F., Hosoya, N., 1985. Functional disability of rat splenocytes provoked to lipid peroxidation by cumene hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta* 845, 43–47.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Sies, H., Cadenas, E., 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 311, 617–631.
- Sims-Robinson, C., Hur, J., Hayes, J.M., Dauch, J.R., Keller, P.J., Brooks, S. V, Feldman, E.L., 2013. The role of oxidative stress in nervous system aging. *PLoS One* 8, e68011. doi:10.1371/journal.pone.0068011
- Sinha, A., Chu, T.T.T., Dao, M., Chandramohanadas, R., 2015. Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and nano-structural alterations upon chemically induced oxidative stress. *Sci. Rep.* 5, 9768. doi:10.1038/srep09768
- Smith, T.C., Gray, G.C., Knoke, J.D., 2000. Is systemic lupus erythematosus, amyotrophic lateral sclerosis, or fibromyalgia associated with Persian Gulf War service? An examination of Department of Defense hospitalization data. *Am. J. Epidemiol.* 151, 1053–1059.
- Spalloni, A., Nutini, M., Longone, P., 2013. Role of the N-methyl-d-aspartate receptors complex in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 312–322. doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.013
- Spruston, N., 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 206–221. doi:10.1038/nrn2286
- Stroppolo, M.E., Sette, M., O'Neill, P., Polizio, F., Cambria, M.T., Desideri, A., 1998. Cu,Zn superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi* is an hyperefficient enzyme.

- Biochemistry 37, 12287–12292. doi:10.1021/bi980563b
- Su, X.W., Clardy, S.L., Stephens, H.E., Simmons, Z., Connor, J.R., 2015. Serum ferritin is elevated in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 16, 102–107. doi:10.3109/21678421.2014.984723
- Sussmuth, S.D., Sperfeld, A.D., Hinz, A., Brettschneider, J., Endruhn, S., Ludolph, A.C., Tumani, H., 2010. CSF glial markers correlate with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 74, 982–987. doi:10.1212/WNL.0b013e3181d5dc3b
- Suzuki, N., Bekkers, J.M., 2007. Inhibitory interneurons in the piriform cortex. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 1064–1069. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04723.x
- Synofzik, M., Ronchi, D., Keskin, I., Basak, A.N., Wilhelm, C., Gobbi, C., Birve, A., Biskup, S., Zecca, C., Fernández-Santiago, R., Kaugesaar, T., Schöls, L., Marklund, S.L., Andersen, P.M., 2012. Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3568–3574. doi:10.1093/hmg/dds188
- Szentágothai, J., 1978. The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 201, 219–248.
- Takahashi, M., Kovalchuk, Y., Attwell, D., 1995. Pre- and postsynaptic determinants of EPSC waveform at cerebellar climbing fiber and parallel fiber to Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* 15, 5693–5702.
- Talley, E.M., Lei, Q., Sirois, J.E., Bayliss, D.A., 2000. TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* 25, 399–410.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., Reiter, R.J., 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42, 28–42. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x
- Thompson, R.F., Kim, J.J., 1996. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13438–13444.
- Tirosh, O., Sen, C.K., Roy, S., Packer, L., 2000. Cellular and mitochondrial changes in glutamate-induced HT4 neuronal cell death. *Neuroscience* 97, 531–541.
- Toivonen, J.M., Manzano, R., Oliván, S., Zaragoza, P., García-Redondo, A., Osta, R., 2014. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9, e89065. doi:10.1371/journal.pone.0089065
- Torres, J., Carrascal, L., 2015. Estudio de la fisiología neuronal mediante la técnica de patch-clamp. ISBN 978-84-16326-03-7.
- Torres-Torrelo, J., Torres, B., Carrascal, L., 2014. Modulation of the input-output function by GABAA receptor-mediated currents in rat oculomotor nucleus motoneurons. *J. Physiol.* 592, 5047–5064. doi:10.1113/jphysiol.2014.276576
- Travis, A.M., Woolsey, C.N., 1956. Motor performance of monkeys after bilateral partial and total cerebral decortications. *Am. J. Phys. Med.* 35, 273–310.
- Troadec, J.D., Marien, M., Darios, F., Hartmann, A., Ruberg, M., Colpaert, F., Michel, P.P., 2001. Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J. Neurochem.* 79, 200–210.
- Turner, M.R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R.G., Pullman, S.L., Rutkove, S.B., Shaw, P.J., Shefner, J., Fischbeck, K.H., 2013.

- Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 14 Suppl 1, 19–32. doi:10.3109/21678421.2013.778554
- Turner, M.R., Kiernan, M.C., 2012. Does interneuronal dysfunction contribute to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis? *Amyotroph. Lateral Scler.* 13, 245–250. doi:10.3109/17482968.2011.636050
- Turner, M.R., Kiernan, M.C., Leigh, P.N., Talbot, K., 2009. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 8, 94–109. doi:10.1016/S1474-4422(08)70293-X
- Valencia, A., Morán, J., 2004. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1112–1125. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.013
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Valverde, F., 2002. Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex. *Rev. Neurol.* 34, 758–780.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., Robberecht, W., 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1762, 1068–1082. doi:10.1016/j.bbadis.2006.05.002
- Vande Velde, C., McDonald, K.K., Boukhedimi, Y., McAlonis-Downes, M., Lobsiger, C.S., Bel Hadj, S., Zandona, A., Julien, J.P., Shah, S.B., Cleveland, D.W., 2011. Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One* 6, e22031. doi: 10.1371/journal.pone.0022031.
- Vannucci, R.C., Brucklacher, R.M., Vannucci, S.J., 2001. Intracellular calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 126, 117–120.
- Verkhatsky, A., Krishtal, O.A., Petersen, O.H., 2006. From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch.* 453, 233–247. doi:10.1007/s00424-006-0169-z
- Viana, F., Bayliss, D.A., Berger, A.J., 1994. Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience* 59, 131–148.
- Vimard, F., Nouvelot, A., Duval, D., 1996. Cytotoxic effects of an oxidative stress on neuronal-like pheochromocytoma cells (PC12). *Biochem. Pharmacol.* 51, 1389–1395.
- Vimard, F., Saucet, M., Nicole, O., Feuilletoy, M., Duval, D., 2011. Toxicity induced by cumene hydroperoxide in PC12 cells: Protective role of thiol donors. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25, 205–215. doi:10.1002/jbt.20377
- Vitalis, T., Rossier, J., 2011. New insights into cortical interneurons development and classification: contribution of developmental studies. *Dev. Neurobiol.* 71, 34–44. doi:10.1002/dneu.20810
- Vogt, C., Vogt, O., 1919. Allgemeinere Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J. Psychol. Neurol.* 25, 292–398.
- von Economo, C., 1930. Cytoarchitecture and progressive cerebation (Presented at the Dedication of the Psychiatric Institute and Hospital, New York, December 4, 1929). *Psychiat. Quart.* 4, 142–150.

- Vroegop, S.M., Decker, D.E., Buxser, S.E., 1995. Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 141–151.
- Vucic, S., Cheah, B.C., Yiannikas, C., Kiernan, M.C., 2011. Cortical excitability distinguishes ALS from mimic disorders. *Clin. Neurophysiol.* 122, 1860–1866. doi:10.1016/j.clinph.2010.12.062
- Vucic, S., Kiernan, M.C., 2009. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Mol. Med.* 9, 255–272.
- Vucic, S., Nicholson, G.A., Kiernan, M.C., 2008. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540–1550. doi:10.1093/brain/awn071
- Wagle-Shukla, A., Ni, Z., Gunraj, C.A., Bahl, N., Chen, R., 2009. Effects of short interval intracortical inhibition and intracortical facilitation on short interval intracortical facilitation in human primary motor cortex. *J. Physiol.* 587, 5665–5678. doi:10.1113/jphysiol.2009.181446
- Wang, H., Lim, P.J., Karbowski, M., Monteiro, M.J., 2009. Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum. Mol. Genet.* 18, 737–752. doi:10.1093/hmg/ddn404
- Weishaupt, J.H., Bartels, C., Pölking, E., Dietrich, J., Rohde, G., Poeggeler, B., Mertens, N., Sperling, S., Bohn, M., Hüther, G., Schneider, A., Bach, A., Sirén, A.-L., Hardeland, R., Bähr, M., Nave, K.-A., Ehrenreich, H., 2006. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J. Pineal Res.* 41, 313–23. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00377.x
- Williams, K.L., Fifita, J.A., Vucic, S., Durnall, J.C., Kiernan, M.C., Blair, I.P., Nicholson, G.A., 2013. Pathophysiological insights into ALS with C9ORF72 expansions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 931–935. doi:10.1136/jnnp-2012-304529
- Wilson, M.E., Boumaza, I., Lacomis, D., Bowser, R., 2010. Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 5, e15133. doi:10.1371/journal.pone.0015133
- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., Monticelli, L., 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93, 4225–436. doi:10.1529/biophysj.107.112565
- Woolsey, C.N., 1946. Comparative studies on dual somatic afferent areas in cerebral cortex of rabbit, cat, dog, pig, sheep and monkey. *Fed. Proc.* 5, 116.
- Xiang, W., Schlachetzki, J.C.M., Helling, S., Bussmann, J.C., Berlinghof, M., Schäffer, T.E., Marcus, K., Winkler, J., Klucken, J., Becker, C.M., 2013. Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* 54, 71–83. doi:10.1016/j.mcn.2013.01.004
- Yin, B., Barrionuevo, G., Batinic-Haberle, I., Sandberg, M., Weber, S.G., 2017. Differences in Reperfusion-Induced Mitochondrial Oxidative Stress and Cell Death Between Hippocampal CA1 and CA3 Subfields Are Due to the Mitochondrial Thioredoxin System. *Antioxid. Redox Signal.* ars.2016.6706. doi:10.1089/ars.2016.6706
- Zaitsev, A. V., Povysheva, N. V., Gonzalez-Burgos, G., Lewis, D.A., 2012. Electrophysiological classes of layer 2/3 pyramidal cells in monkey prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.* 108, 595–609. doi:10.1152/jn.00859.2011
- Zanette, G., Tamburin, S., Manganotti, P., Refatti, N., Forgiione, A., Rizzuto, N., 2002a. Changes in motor cortex inhibition over time in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.*

- 249, 1723–1728. doi:10.1007/s00415-002-0926-7
- Zanette, G., Tamburin, S., Manganotti, P., Refatti, N., Forgione, A., Rizzuto, N., 2002b. Different mechanisms contribute to motor cortex hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 113, 1688–1697.
- Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z., Cox, G.A., Li, Y., Lin, D.T., 2016. Hyperactive somatostatin interneurons contribute to excitotoxicity in neurodegenerative disorders. *Nat. Neurosci.* 19, 557–559. doi:10.1038/nn.4257
- Zhang, Y., Cook, A., Kim, J., Baranov, S. V., Jiang, J., Smith, K., Cormier, K., Bennett, E., Browser, R.P., Day, A.L., Carlisle, D.L., Ferrante, R.J., Wang, X., Friedlander, R.M., 2013. Melatonin inhibits the caspase-1/cytochrome c/caspase-3 cell death pathway, inhibits MT1 receptor loss and delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 55, 26–35. doi:10.1016/j.nbd.2013.03.008
- Zhu, D., Tan, K.S., Zhang, X., Sun, A.Y., Sun, G.Y., Lee, J.C.M., 2005. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J. Cell Sci.* 118, 3695–3703. doi:10.1242/jcs.02507
- Ziemann, U., Winter, M., Reimers, C.D., Reimers, K., Tergau, F., Paulus, W., 1997. Impaired motor cortex inhibition in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Evidence from paired transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 49, 1292–1298.
- Zilles, K., Amunts, K., 2010. Centenary of Brodmann’s map—conception and fate. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 139–145. doi:10.1038/nrn2776
- Zoccollella, S., Santamato, A., Lamberti, P., 2009. Current and emerging treatments for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 5, 577–595.
- Zona, C., Pieri, M., Carunchio, I., 2006. Voltage-dependent sodium channels in spinal cord motor neurons display rapid recovery from fast inactivation in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurophysiol.* 96, 3314–3322. doi:10.1152/jn.00566.2006

9. APÉNDICE: Publicaciones y Patente

PUBLICACIONES

- Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Ayala A, Nunez-Abades P (2015) Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. *Neuroscience* 289C: 85–98.
- Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Muñoz MF, Ayala A, Nunez-Abades P (2016) Time and dose dependent effects of oxidative stress induced by cumene hydroperoxide in neuronal excitability of rat motor cortex neurons. *Neurotoxicology* 53:201-214.
- Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Barrionuevo G, Nunez-Abades P (2017) Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide produces synaptic depression and transient hyperexcitability in rat primary motor cortex neurons. *Mol Cell Neurosci* 82:204-217.

ABSTRACTS

- Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Nunez-Abades P (2014) Oxidative stress induced by cumene hydroperoxide evokes changes in membrane properties of motor cortex neurons. XXXVII Congreso de la SECF, Granada 2014. Publicado en: *Acta Physiologica* 212, issue supplement s698, pag 79.
- Carrascal L, Pardillo-Díaz R, Barrionuevo G, Nunez-Abades P (2016) Lipid peroxidation induced by cumene hydroperoxide produces synaptic depression in rat primary motor cortex neurons. XXXVIII Congreso de la SECF, Zaragoza 2016. Publicado en: *J Physiol Biochem* 72:S1-S111.
- Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Nunez-Abades PA (2016) Implicación de la peroxidación lipídica en neuronas de la corteza motora en esclerosis lateral amiotrófica. I Congreso Nacional de Investigación en ELA, Sevilla 2016.

PATENTE

- Nunez-Abades P, Pardillo-Díaz R, Carrascal L, Cano M, Muñoz M, Ayala A. “Kit y método de cuantificación de la toxicidad en neuronas de la corteza cerebral para la detección de enfermedades neurodegenerativas”. Fecha de prioridad: 21/10/2015. Número de registro: P201500766